

Aus dem Johannes-Müller-Institut für Physiologie  
der Medizinischen Fakultät der Charité –  
Universitätsmedizin Berlin

D I S S E R T A T I O N

Einfluß einer chronischen Aktivierung  
des Renin-Angiotensin-Systems auf  
die Variabilität von Blutdruck und  
Herzfrequenz bei wachen Ratten

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae  
(Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité –  
Universitätsmedizin Berlin

von  
Thomas Hoff  
aus Ulm/Donau

Dekane: Prof. Dr. med. Joachim W. Dudenhausen  
Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. Pontus B. Persson  
2. Prof. Dr. med. Heinz-Joachim Häbler  
3. Prof. Dr. med. Heimo Ehmke

Eingereicht am: 01. März 2004  
Datum der Promotion: 13. September 2004

# Widmung

Meiner lieben Mutter

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Historischer Rückblick . . . . .	1
1.2	Barorezeptor-Reflex . . . . .	3
1.3	Epidemiologische Daten zur Hypertonie . . . . .	5
1.4	Diagnostik der Hypertonie . . . . .	7
1.5	Powerspektralanalyse in der Medizin . . . . .	9
1.6	Ziele der Studie . . . . .	12
<b>2</b>	<b>Methoden</b>	<b>13</b>
2.1	Tiere . . . . .	13
2.1.1	Tierstämme . . . . .	13
2.1.2	Tierhaltung . . . . .	14
2.2	Operationstechniken . . . . .	14
2.2.1	Anästhesie und Operationsvorbereitung . . . . .	14
2.2.2	Implantation des Telemetriesenders . . . . .	15
2.2.3	Implantation des Nierenarterienclips . . . . .	18
2.2.4	Explantation des Nierenarterienclips . . . . .	21
2.2.5	Implantation von venösen und arteriellen Gefäßkathetern . . . . .	22
2.3	Hämodynamik . . . . .	23
2.3.1	Telemetrische Blutdruck- und Herzfrequenzmessungen . . . . .	23
2.4	Ermittelte Parameter . . . . .	24
2.4.1	Trinkmenge . . . . .	24
2.4.2	Körpergewicht . . . . .	24
2.4.3	Hydralazin-Dosierung . . . . .	24
2.4.4	Reninbestimmung (Angiotensin I RIA) . . . . .	25
2.4.5	Barorezeptor-Reflex . . . . .	27
2.5	Autoregressive Powerspektralanalyse . . . . .	28
2.6	Protokolle . . . . .	30
2.6.1	Powerspektralanalyse bei stimuliertem RAS . . . . .	30
2.6.2	Powerspektralanalyse bei doppelt-transgenen Ratten . . . . .	32
2.7	Geräte und Materialien . . . . .	34



2.7.1	Geräte . . . . .	34
2.7.2	Pharmaka . . . . .	34
2.7.3	Verbrauchsmaterial . . . . .	35
2.8	Statistik . . . . .	35
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>36</b>
3.1	Überlebenszeiten . . . . .	36
3.1.1	Powerspektralanalyse bei stimuliertem RAS . . . . .	36
3.1.2	Powerspektralanalyse bei doppelt-transgenen Ratten . . . . .	37
3.2	Körpergewicht . . . . .	38
3.3	Trinkmenge . . . . .	40
3.4	Tägliche Hydralazindosis . . . . .	41
3.5	Reninaktivität . . . . .	42
3.6	Originalregistrierungen . . . . .	44
3.6.1	Wistar-Ratten . . . . .	44
3.6.2	Brown-Norway-Katholiek-Ratten . . . . .	47
3.6.3	Doppelt-transgene Sprague-Dawley-Ratten . . . . .	50
3.7	Blutdruck und Herzfrequenz . . . . .	51
3.7.1	Wistar-Ratten . . . . .	51
3.7.2	Brown-Norway-Katholiek-Ratten . . . . .	53
3.7.3	Relative Blutdruckänderungen . . . . .	54
3.7.4	Doppelt-transgene Sprague-Dawley-Ratten . . . . .	55
3.8	Barorezeptor-Reflex . . . . .	57
3.8.1	Spontan auftretende Reflexaktivität . . . . .	57
3.8.2	Sensitivität des Barorezeptor-Reflexes . . . . .	59
3.9	Powerspektren des Blutdrucks . . . . .	60
3.9.1	Wistar-Ratten . . . . .	60
3.9.2	Brown-Norway-Katholiek-Ratten . . . . .	62
3.9.3	Zeitverlauf der $LF_{BP}$ -Power . . . . .	64
3.9.4	Gesamtes Powerspektrum . . . . .	69
3.9.5	Doppelt-transgene Sprague-Dawley-Ratten . . . . .	71
3.10	Powerspektren der Herzfrequenz . . . . .	74
3.11	Korrelation zwischen $LF_{BP}$ -Power und BP . . . . .	75
3.11.1	Wistar-Ratten . . . . .	75
3.11.2	Brown-Norway-Katholiek-Ratten . . . . .	76
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>77</b>
4.1	Doppelt-transgene Sprague-Dawley-Ratten . . . . .	84
4.2	Methodenkritik . . . . .	86
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>94</b>

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Sensitivitätsbestimmung des Barorezeptor-Reflexes . . . . .	4
1.2	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System . . . . .	6
1.3	Blutdruckkurve als Beispiel einer Fourier-Transformation . . . . .	8
1.4	Powerspektrum . . . . .	9
1.5	Spektralanalyse bei renovaskulärer Hypertonie . . . . .	11
2.1	Operationssitus mit freipräparierter Aorta abdominalis . . . . .	15
2.2	Punktion der Aorta . . . . .	16
2.3	Aufdehnung der Punktionsstelle . . . . .	16
2.4	Fixierung des Katheters . . . . .	17
2.5	Situs mit aufgespannter Nierenarterie . . . . .	18
2.6	Implantation des Nierenarterienclips . . . . .	19
2.7	Lage des Nierenarterienclips . . . . .	19
2.8	Fixierung des Clips . . . . .	20
2.9	Explantation des Nierenarterienclips . . . . .	21
2.10	Telemetriesender . . . . .	23
2.11	Versuchsprotokoll . . . . .	30
2.12	Protokoll transgene Ratten . . . . .	32
2.13	Operationsbesteck . . . . .	34
3.1	Gewichtsverlauf aller Versuchsgruppen . . . . .	38
3.2	Tägliche Trinkmenge . . . . .	40
3.3	Applizierte Hydralazindosis während der Clipphase . . . . .	41
3.4	Reninaktivitäten . . . . .	42
3.5	BP- und HF-Registrierungen aus der Wistar-Kontrollgruppe . . . . .	44
3.6	24-h-Blutdruck-Registrierung eines Wistar-Kontrolltieres . . . . .	45
3.7	BP- und HF-Registrierungen aus der mit Hydralazin behandelten Wistar-Gruppe . . . . .	46
3.8	BP- und HF-Registrierungen aus der Brown-Norway-Katholiek- Kontrollgruppe . . . . .	47
3.9	24-h-Blutdruck-Registrierung eines Kontrolltieres aus dem Brown-Norway-Katholiek-Tierstamm . . . . .	48

3.10	BP- und HF-Frequenzregistrierungen aus der mit Hydralazin behandelten Brown-Norway-Katholiek-Gruppe . . . . .	49
3.11	BP- und HF-Registrierung einer transgenen Sprague-Dawley-Ratte . . . . .	50
3.12	Zeitverlauf von BP und HF beider Wistar-Gruppen . . . . .	51
3.13	Zeitverlauf von BP und HF beider Brown-Norway-Katholiek-Gruppen . . . . .	53
3.14	Relative BP-Änderungen . . . . .	54
3.15	BP und HF der transgenen Sprague-Dawley-Ratten und des Wildtyps . . . . .	55
3.16	Spontan auftretende Barorezeptor-Reflexaktivität . . . . .	57
3.17	Steigung des Barorezeptor-Reflexes . . . . .	59
3.18	BP-Registrierungen mit dazugehörigen Powerspektren einer Wistar-Kontrollratte . . . . .	60
3.19	BP-Registrierungen mit dazugehörigen Powerspektren aus der Hydralazingruppe der Wistar-Ratten . . . . .	61
3.20	BP-Registrierungen mit dazugehörigen Powerspektren einer Brown-Norway-Katholiek-Kontrollratte . . . . .	62
3.21	BP-Registrierungen mit dazugehörigen Powerspektren aus der Hydralazingruppe der Brown-Norway-Katholiek-Ratten . . . . .	63
3.22	Höhenliniendiagramme der BP-Powerspektren . . . . .	64
3.23	Zeitverlauf von $LF_{BP}$ -Power und Blutdruckvariabilität beider Wistar-Gruppen . . . . .	65
3.24	Zeitverlauf von $LF_{BP}$ -Power und Blutdruckvariabilität beider Brown-Norway-Katholiek-Gruppen . . . . .	67
3.25	Absolute BP-Powerspektren beider Tierstämme . . . . .	69
3.26	Absolutes Powerspektrum der transgenen Sprague-Dawley-Ratten . . . . .	71
3.27	Relatives Powerspektrum der transgenen Sprague-Dawley-Ratten . . . . .	72
3.28	Höhenliniendiagramme der HF-Powerspektren . . . . .	74
3.29	Korrelation zwischen $LF_{BP}$ -Power und BP in der Wistar-Gruppe . . . . .	75
3.30	Korrelation zwischen $LF_{BP}$ -Power und BP in der Brown-Norway-Katholiek-Gruppe . . . . .	76

# Kapitel 1

## Einleitung

### 1.1 Historischer Rückblick

Die Erforschung dessen, was heute unter dem Begriff Renin-Angiotensin-Aldosteron-System zusammengefaßt wird, begann mit der Entdeckung eines „nicht dialysierbaren, eine akute Blutdruckzunahme verursachenden Stoffes“ durch eine schwedische Forschergruppe um den Physiologen Robert Tigerstedt und dessen Schüler Per Bergmann im Jahre 1898 [116]. Angeregt durch die Überlegungen Brown-Séquards [21], daß Organe neben ihrer eigentlichen Organfunktion auch Aufgaben für den gesamten Körperkreislauf im Sinne einer „inneren Sekretion“ ausüben können, injizierte die Forschergruppe um R. Tigerstedt gesunden Kaninchen intravenös ein wässriges Extrakt aus gesunden Kaninchennieren. Hierdurch ließ sich eine „ziemlich lang anhaltende Steigerung des arteriellen Blutdrucks“ hervorrufen. Tigerstedt und Bergmann konnten zeigen, daß die Ursache hierfür nicht eine bereits bekannte, im Harn ausgeschiedene Substanz war, sondern daß es sich um eine Substanz *sui generis* handelte. Sie bezeichneten diese humoral aktive Substanz mit dem Namen „Renin“.

Da in den darauffolgenden Jahren von verschiedenen Forschergruppen sowohl vergeblich versucht wurde, die Ergebnisse von Tigerstedt und Bergmann zu reproduzieren als auch der Versuch erfolglos blieb, eine renale Hypertonie im Tierexperiment zu erzeugen, gerieten die Entdeckungen Tigerstedts zunehmend in Vergessenheit. Obwohl Franz Volhard mit der Vermutung, daß der chronisch renale Bluthochdruck auf eine Reninfreisetzung im Gefolge einer Nierenischämie zurückzuführen sei [120], den Zusammenhang zwischen Tigerstedts Ergebnissen und der renalen Hypertonie gedanklich hergestellt hatte, blieb ihm der experimentelle Beweis vorenthalten.

Das Interesse an den Entdeckungen Tigerstedts wurde durch das heute klassische Experiment von Harry Goldblatt im Jahre 1934 wieder entfacht [43].

Um den Zusammenhang zwischen Nierenperfusion, renalem Blutfluß und Nierenfunktion untersuchen zu können, induzierte Goldblatt bei Hunden experimentell verschiedene Schweregrade einer verminderten Nierenperfusion durch Einengung der Nierenarterie mittels eines Clips und ermittelte den korrespondierenden renalen Blutfluß. Im Rahmen dieses Versuchsaufbaus ließ sich – abhängig vom Grad der Nierenarterieneinengung – ein anhaltender Bluthochdruck erzeugen, wobei gleichzeitig die Nierenfunktion um so mehr beeinträchtigt wurde, je stärker die Perfusion gedrosselt wurde.

In darauffolgenden Studien konnten Forschergruppen um Page und Helmer in den Vereinigten Staaten und Braun-Menendez in Südamerika zeigen, daß das Renin nicht vasopressorisch per se wirkt, sondern enzymatisch zur Freisetzung einer vasopressorisch wirkenden Substanz führt [19, 79, 80]. Page und Helmer griffen hierbei die Theorie Brown-Séquards wieder auf, daß Organe neben ihrer eigentlichen Organfunktion endokrin aktiv sein können. Sie sahen in der Entdeckung, daß Renin zusammen mit einem Renin-Aktivator zur Freisetzung von Angiotonin führt, eine effiziente humorale Regulationsmethode, um das Niveau des arteriellen Blutdrucks konstant zu halten.

In den darauffolgenden Jahren machte sich bei der Erforschung der an den enzymatischen Reaktionen beteiligten Substanzen neben der o.g. Gruppe um Irvine Page vor allem eine Forschergruppe um Leonard Skeggs einen Namen [68, 79, 80, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100]. Für die pressorisch wirksame Substanz wählten beide Forschergruppen jedoch einen unterschiedlichen Ausdruck. Während Page und Helmer hierfür den Namen **Angiotonin** verwendeten, bezeichnete sie die Gruppe um Skeggs als **Hypertensin**. Man einigte sich schließlich auf den heute noch gültigen Begriff „Angiotensin“.

Bei dem Versuch, die pressorisch wirksame Substanz zu isolieren, kam die Forschergruppe um Skeggs Mitte der fünfziger Jahre zufällig zu der Erkenntnis, daß das initial als pressorisch wirksam angenommene „Hypertensin I“ zwar das Produkt einer enzymatischen Reaktion zwischen Renin und seinem Substrat war, jedoch umgehend durch ein weiteres plasmatisches Enzym in das konstriktorische „Hypertensin II“ umgewandelt wurde [99]. Dem Enzym, welches diese Reaktion katalysiert, gaben sie den Namen „converting enzyme“ [96, 98]. Sie fanden heraus, daß dieses Enzym durch Chlorid-Ionen aktiviert wurde und als Dipeptidase aus dem Dekapeptid „Hypertensin I“ das Oktapeptid „Hypertensin II“ entstehen ließ.

Bei Untersuchungen zur Inaktivierung von Bradykinin kam eine Forschergruppe um H.Y.T. Yang gut zehn Jahre später zufällig zu der Entdeckung, daß Bradykinin neben der bisher bekannten Carboxypeptidase N noch durch ein zweites Enzym, die sogenannte „Kininase II“, degradiert wird [125]. Dieses Enzym fungiert ebenfalls als Carboxypeptidase und spaltet vom C-terminalen Ende von Peptiden das

Dipeptid Phenylalanylarginin ab. Die Forscher konnten in dieser Arbeit zeigen, daß es sich bei der „Kininase II“ um dasselbe Enzym handelte, welches das Dekapeptid „Angiotensin I“ in das Oktapeptid „Angiotensin II“ umwandelt. Somit konnte erstmals ein Zusammenhang zwischen dem Renin-Angiotensin-System (RAS) und dem Kallikrein-Kinin-System (KKS) nachgewiesen werden.

Obwohl die Isolierung, Sequenzierung und Synthese von Hypertensin II gegen Ende der fünfziger Jahre gelang [22, 36, 82, 97, 98], vermochte keine der Forschergruppen einen Zusammenhang zwischen Renin- bzw. Angiotensin-Spiegeln und Blutdruckregulation respektive experimenteller bzw. klinisch-manifester Hypertonie herzustellen. Hierdurch blieb der exakte Wirkmechanismus dieses hormonellen Regulationssystems bei der Kontrolle des Blutdrucks weiterhin nicht vollständig geklärt.

Etwa im gleichen Zeitraum, in dem die Erkenntnis gewonnen wurde, daß Renin nicht pressorisch per se wirkt, sondern vielmehr im Sinne eines enzymatisch-kaskadenartigen Mechanismus, wurde das Aldosteron durch S.A. Simpson [93] entdeckt. Simpson konnte eine potente mineralokortikoide Wirkung für dieses Nebennierenrinden-Hormon nachweisen. Der Zusammenhang von Aldosteron mit der Wirkungsweise des Renin-Angiotensin-Systems blieb zunächst verborgen. Anfang der sechziger Jahre gelang verschiedenen Forschergruppen der Nachweis, daß Angiotensin II ein wichtiger Regulator der Aldosteron-Sekretion ist [5, 13, 25, 34, 39, 48, 66]. In einer Reihe faszinierender Experimente konnte in den folgenden Jahren vor allem durch eine Arbeitsgruppe um Franz Gross eine enge Korrelation zwischen Nieren- bzw. Nebennierenfunktion und der Kontrolle des extrazellulären Flüssigkeitshaushaltes gezeigt werden [26, 35, 47, 48, 49, 65, 76]. Somit konnte das gegenwärtige Konzept des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems mit seiner Bedeutung für die Homöostase von Blutdruck und extrazellulärem Flüssigkeitsvolumen zu Beginn der sechziger Jahre des 20. Jahrhunderts entschlüsselt werden.

## 1.2 Barorezeptor-Reflex

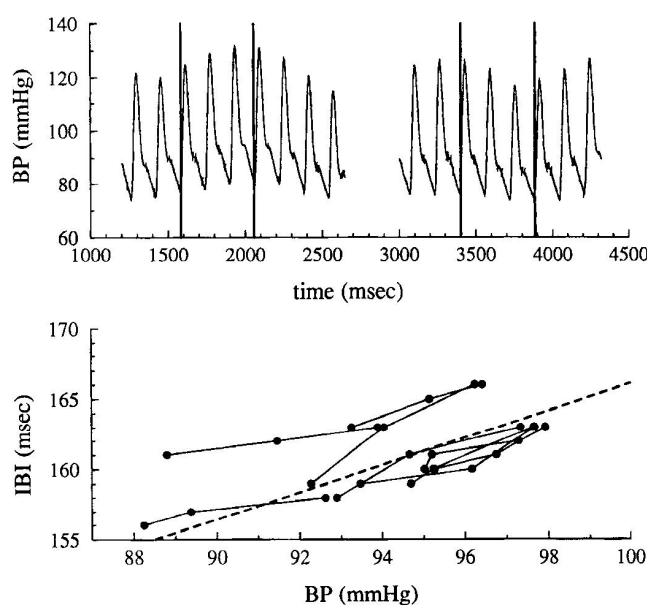
Die kurzfristige Regulation des Blutdrucks und der Herzfrequenz wird überwiegend über Kreislaufreflexe gesteuert, die auf reflektorischen Veränderungen der Herztätigkeit und des Gefäßtonus beruhen. Eine wichtige Rolle bei dieser innerhalb von Sekunden stattfindenden Regulation spielt der Baro- (oder Presso-) rezeptoren-Reflex (BRR).

Rezeptoren des BRR sind in der Aorta und im Bereich des Carotissinus lokalisiert. Diese Rezeptoren erfassen neben dem absoluten Dehnungszustand der Gefäße vor allem zeitliche Änderungen des Gefäßtonus.

Afferente parasympathische Neurone dieses Reflexbogens schließen sich dem N. glossopharyngeus bzw. dem N. vagus an. In der Medulla oblongata erfolgt in den medialen Kerngebieten des Nucleus tractus solitarii (NTS) eine Umschaltung auf sekundäre Neurone, die mit den Kerngebieten in der rostralen ventrolateralen Medulla oblongata (RVLM) in Wechselwirkung treten. Hier wird die Grundaktivität des Sympathikus beeinflusst, indem sympathoexzitatorische Neurone in ihrer Aktivität gehemmt werden. Unter Ruhebedingungen überwiegt ein tonisch-inhibitorischer Einfluß des BRR auf die Sympathikusaktivität.

Gängige Verfahren zur Prüfung und Quantifizierung des Barorezeptor-Reflexes (BRR) gehen auf die sogenannte „Oxford-Methode“ zurück, die von P. Sleight und H. S. Smyth im Jahre 1969 publiziert wurde [101]. Bei dieser Methode werden Blutdruckanstiege bzw. -abfälle pharmakologisch induziert und die dadurch hervorgerufenen Änderungen des Blutdrucks und der Herzfrequenz untersucht.

Mitte der achtziger Jahre führte Giovanni Bertinieri eine neue Methode zur Beurteilung des Barorezeptor-Reflexes in die kardiovaskuläre Forschung ein [8, 9], die seitdem durch mehrere Forschergruppen validiert werden konnte [44, 56, 109, 123]. Zur Verdeutlichung dieser Methode dient Abbildung 1.1.



Stauss et al., Am. J. Physiol., 272(2Pt2), 1997

Abbildung 1.1: Methode zur Sensitivitätsbestimmung des Barorezeptor-Reflexes. Die in der oberen Blutdruckregistrierung zwischen den vertikalen Linien dargestellten Sequenzen zeichnen sich dadurch aus, daß entweder sowohl Blutdruck und RR-Intervall zunehmen („up“-Sequenzen, links) oder abnehmen („down“-Sequenzen, rechts). Unten: Sensitivität des Barorezeptor-Reflexes (gestrichelte Linie).

Diese Methode nutzt physiologisch auftretende Blutdruckschwankungen und erfaßt hierbei spontan auftretende Sequenzen von drei oder mehr Herzaktionen, in denen der systolische Blutdruck ansteigt und sich das dazugehörige Pulsintervall vergrößert (Typ-I- oder „up“-Sequenzen) oder der Blutdruck abfällt und das Pulsintervall kleiner wird (Typ-II- oder „down“-Sequenzen).

Von jeder dieser „up“- und „down“-Sequenzen läßt sich eine Regressionsgerade aus dem dazugehörigen Blutdruck und RR-Interval berechnen. Die Steigung dieser Regressionsgeraden dient als Maß der Sensitivität des Barorezeptor-Reflexes.

### 1.3 Epidemiologische Daten zur Hypertonie

Mit einer Prävalenz von etwa 20 % in den westlichen Industrienationen stellt die Hypertonie das wahrscheinlich wichtigste Problem im gesellschaftlichen Gesundheitswesen dar. Unbehandelt sterben etwa die Hälfte aller Hypertoniker an den Folgen einer sich entwickelnden koronaren Herzkrankheit (KHK), hierbei ist der Herzinfarkt die häufigste Todesursache. Etwa ein Drittel der Patienten erleidet zerebrovaskuläre Komplikationen, zu denen vor allem der Schlaganfall zählt; 10-15 % sterben an den Folgen einer sich entwickelnden Niereninsuffizienz.

Bei der Entstehung einer koronaren Herzkrankheit (KHK) ist die Hypertonie ein bedeutender Risikofaktor. Die KHK ist die häufigste Todesursache in Deutschland; Etwa 10-15 % der männlichen Bevölkerung leiden an dieser Erkrankung der Herzkranzgefäße. Neben Diabetes mellitus, Fettstoffwechselstörungen, Adipositas, Nikotinabusus, Hyperfibrinogenämie und positiver Familienanamnese wird die Hypertonie zu den Risikofaktoren 1. Ordnung gezählt.

Als Hypertonie werden laut WHO Blutdruckwerte  $\geq 160/95$  mmHg klassifiziert. Blutdruckwerte zwischen 140/90 und 160/95 mmHg gelten als Grenzwert-hypertonie. Von einem normotensiven Blutdruckniveau spricht man bei Blutdruckwerten  $\leq 140/90$  mmHg [124].

Eine kürzlich im New England Journal of Medicine publizierte Studie [119] konnte zeigen, daß auch innerhalb der laut WHO als normotensiv einzustufenden Blutdruckwerte mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen und Komplikationen zu rechnen ist, so daß einer suffizienten Blutdruckeinstellung höchste Priorität bei der Primär- und Sekundärprophylaxe zukommt.

Bei über 90 % der Hochdruckkrankheiten handelt es sich um sogenannte essentielle Hypertonien. Die Pathogenese dieser Hypertonien kann derzeit nicht eindeutig geklärt werden. Von diesen primären Formen lassen sich die sekundären arteriellen Hypertonieformen abgrenzen, bei denen die zur Blutdruckerhöhung führende Pathogenese aufgeklärt ist. Fast alle diese sekundären Formen, deren Prävalenz unter 10 % liegt, sind mit Störungen im Hormonhaushalt und/oder der Nierenfunktion verbunden.



Neben Allgemeinmaßnahmen wie Gewichtsnormalisierung, salzarter Diät und körperlicher Bewegung stehen mit  $\beta$ -Blockern, ACE-Hemmern, Diuretika, Calcium-Antagonisten und  $\alpha_1$ -adrenergen Rezeptorantagonisten sowie neuerdings auch  $AT_1$ -Antagonisten heutzutage medikamentös potente Antihypertensiva mit unterschiedlichem Wirkansatz zur Verfügung. Die antihypertensive Therapie kann durch eine Kombination der verschiedenen Wirkstoffklassen gemäß dem Stufenplan der WHO [124] an die Blutdruckwerte angepaßt und intensiviert werden. Zu betonen ist, daß eine kausale Therapie bei der essentiellen Hypertonie nicht möglich ist. Bei der medikamentösen Therapie dieser Hochdruckform handelt es sich um rein symptomatische Maßnahmen.

Im Gegensatz zu der essentiellen Hypertonie läßt sich bei den sekundären Hypertonieformen die Ursache des Bluthochdrucks ermitteln und entsprechend therapieren. In der überwiegenden Anzahl der Fälle kann die Ursache des Hochdrucks beseitigt werden, so daß die Therapie eine kausale ist.

So liegt beispielsweise der renovaskulären Hypertonie (RVH) eine ein- oder doppelseitige Einengung der A. renalis oder ihrer Hauptäste zugrunde. Der post-stenotische Blutdruckabfall führt zu einer Abnahme des renalen Blutflusses, die wiederum die Bildung von Renin in den juxtaglomerulären Zellen der Niere zur Folge hat (s. Abb. 1.2).

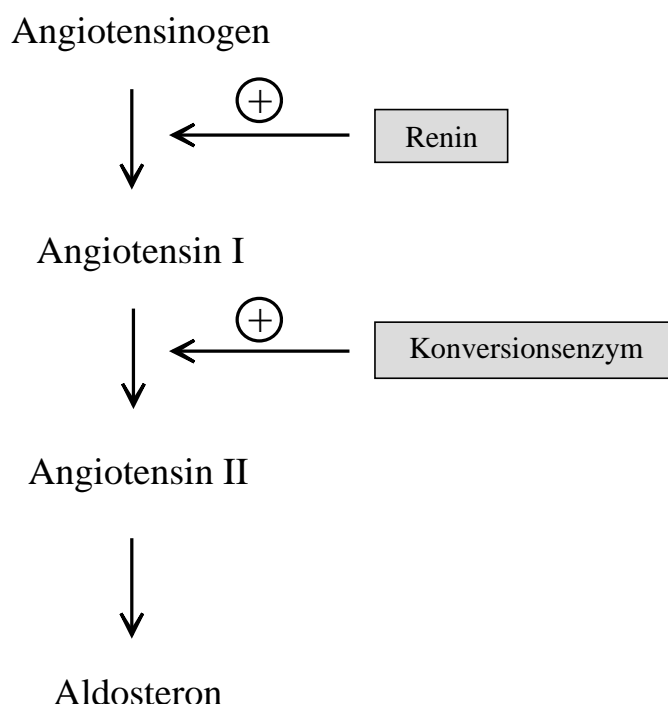


Abbildung 1.2: Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

Durch das proteolytisch wirksame Renin wird aus dem inaktiven Angiotensinogen ( $\alpha_2$ -Plasmaglobulin) das Dekapeptid Angiotensin I gebildet. Nach Abspaltung von zwei Aminosäuren entsteht unter dem Einfluß des Konversions-enzym (= angiotensin converting enzyme, ACE), einer Peptidyldipeptidase, das Oktapeptid Angiotensin II. Dieses wiederum ist ein potenter Vasokonstriktor und wichtigster Stimulator der Aldosteronbildung in der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde. Die Hauptwirkung dieses Mineralocorticoids besteht in einem Austausch von Kalium- und Wasserstoffionen gegen Natriumionen im distalen Tubulus der Niere.

Bei der renovaskulären Hypertonie ist die Bildung des potenten Vasokonstriktors Angiotensin II aus Angiotensinogen und Angiotensin I infolge einer Aktivierung dieser Hormonkaskade Ursache der pathologischen Blutdruckerhöhung.

Durch eine Korrektur des Strömungshindernisses in der A. renalis, z.B. mittels perkutaner transluminaler Angioplastie (PTA) oder rekonstruktiver Operationsverfahren, läßt sich hier in den meisten Fällen eine Normalisierung der Strömungsverhältnisse und Nierenperfusion erreichen. Durch Beseitigung der Nierenarterienstenose als Ursache der Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems und der konsekutiven Blutdruckerhöhung kann die Hypertonie in vielen Fällen kausal therapiert werden. Eine Ausnahme stellen jedoch die chronischen Formen der Hypertonie dar. Aus noch nicht vollständig geklärten Gründen führt eine chronische Blutdruckerhöhung zu einer fixierten Hypertonie. Eine kausale Therapie ist dann wenig erfolgversprechend.

Für eine effektive antihypertensive Therapie ist deshalb eine diagnostisch-pathogenetische Klärung der Hypertonieursache wünschenswert. Diesem Schritt kommt also eine entscheidende Rolle bei einer suffizienten Therapie zu. Das Entschlüsseln der Pathogenese ermöglicht es hier, die Hypertonie nicht nur rein symptomatisch, sondern auch kausal zu therapieren.

## 1.4 Diagnostik der Hypertonie

Eine Besonderheit des Symptoms „Hypertonie“ besteht darin, daß die Diagnose schnell und mit verhältnismäßig einfachen Mitteln gestellt werden kann. Eine Unterscheidung zwischen primärer und sekundärer Hypertonie ist in der Regel bei Diagnosestellung aber nicht möglich. Neben den apparativen und labormedizinischen Verfahren, welche die Diagnosestellung einer sekundären Hypertonie ermöglichen, gewann deshalb innerhalb der letzten zehn- bis fünfzehn Jahre die Auswertung von Blutdruck- und Herzfrequenzkurven unter Zuhilfenahme der Powerspektralanalyse eine immer größer werdende klinische und vor allem wissenschaftliche Bedeutung.

Die Powerspektralanalyse beruht auf einer durch den französischen Baron und Mathematiker Jean-Baptiste-Joseph Fourier (1768-1830) entwickelten, sogenannten Fourier-Transformation. Grundgedanke dieser Methode ist, daß eine mathematisch schwer zu beschreibende Verteilung, wie beispielsweise der Blutdruck, darstellbar ist anhand einer unendlichen Summe leichter zu handhabender, periodischer Sinus- und Cosinusfunktionen. Durch diese mathematische Methode läßt sich eine unstetige Funktion als Summe stetiger, sinusförmiger Funktionen darstellen [18]. Vereinfacht ausgedrückt ist die Powerspektralanalyse ein mathematisches Verfahren, das eine Meßkurve (z.B. kontinuierliche Blutdruckregistrierung) in viele Sinuskurven zerlegt. Die Summe aller dieser Sinuskurven entspricht dann wieder dem Ausgangssignal. Zur Verdeutlichung dient Abbildung 1.3:

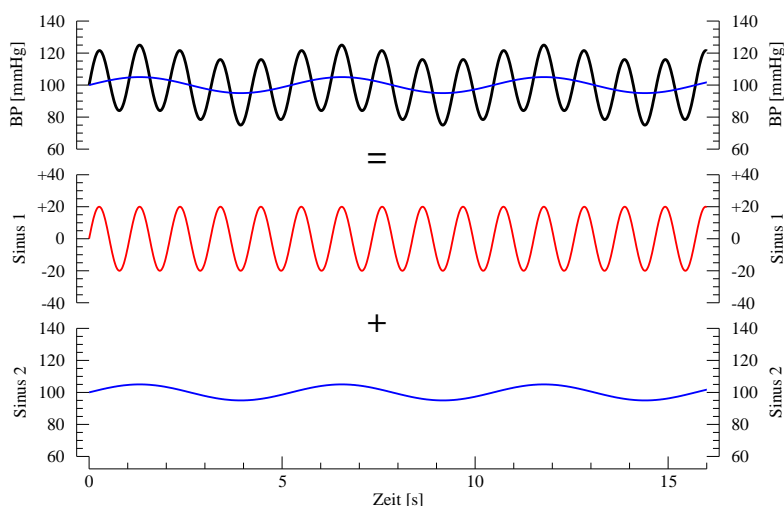


Abbildung 1.3: Blutdruckkurve als Beispiel einer Fourier-Transformation

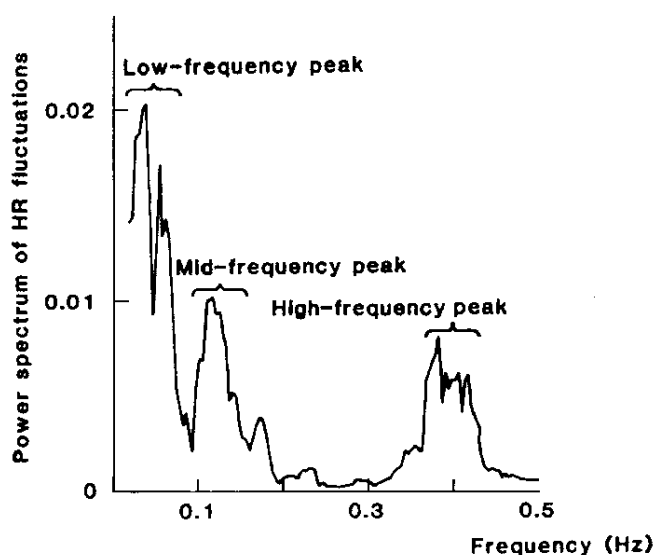
Die Powerspektralanalyse des Blutdrucks z.B. ergibt u.a. eine Sinusschwingung, welche die Frequenz der Herzfrequenz aufweist (diastolisch/systolische Blutdruckschwankungen). Die Amplitude dieser Sinuskurve entspricht der Blutdruckamplitude.

Die graphische Darstellung eines Powerspektrums erfolgt dadurch, daß alle Sinuskurven, die sich aus der Spektralanalyse ergeben, in ein zweidimensionales Diagramm eingetragen werden. Dabei wird für jede Sinusschwingung ein Maß der Amplitude (spektrale Power) auf der Ordinate gegen die Frequenz auf der Abszisse aufgetragen.

## 1.5 Powerspektralanalyse in der Medizin

Anfang der siebziger Jahre erfolgten Pionierarbeiten bei der Anwendung der Powerspektralanalyse in der Medizin. Hyndman, Kitney, Sayers und Rompelman nutzten die Powerspektralanalyse zur Frequenzanalyse von hämodynamischen Parametern wie der Herzfrequenz oder des arteriellen Blutdrucks [57, 63, 64, 92].

Sie konnten hierbei drei Peaks in unterschiedlichen Frequenzbereichen identifizieren, die von Solange Akselrod Anfang der achtziger Jahre bestätigt werden konnten ([3], s. Abb. 1.4).



Akselrod et al., Science, Vol. 213, 10 July 1981

Abbildung 1.4: Powerspektrum

Die Frequenzen im Powerspektrum von Blutdruck und Herzfrequenz werden üblicherweise in drei Bereiche eingeteilt, wobei Frequenzen oberhalb der Atemfrequenz nicht berücksichtigt werden. Systolisch/diastolische Blutdruckschwankungen, die der Herzfrequenz entsprechen, werden also nicht dargestellt. Üblicherweise werden die folgenden drei Frequenzbereiche im Powerspektrum des Blutdrucks und der Herzfrequenz betrachtet:

- Hochfrequenter Bereich (HF; Atemfrequenz)

Die hochfrequenten Anteile im Powerspektrum von Blutdruck und Herzfrequenz sind im Bereich der Atemfrequenz lokalisiert. Zyklische Veränderungen von Blutdruck und Herzfrequenz im Rahmen der Atmung

wurden bereits im Jahre 1783 von Stephen Hales beobachtet und beschrieben [52] und sind im Powerspektrum von Blutdruck und Herzfrequenz meistens als klar abgegrenzter Peak sichtbar. Dieser Peak ändert seine Frequenzlokalisierung abhängig von der Atmung.

- Mittelfrequenter Bereich (MF; sympathisch vermittelte Oszillationen)

Blutdruckschwankungen mit Frequenzen unterhalb der Atemfrequenz wurden bereits im 19. Jahrhundert durch Hering und Breuer [20, 55], Traube [117] sowie Mayer [75] beschrieben. Diese sogenannten „Mayer-Wellen“ werden heute als Antwort des kardiovaskulären Regulationssystems auf den Barorezeptor-Reflex (BRR) angesehen [29, 114, 126].

- Niederfrequenter Bereich (LF; humoral und thermoregulatorisch vermittelte Oszillationen)

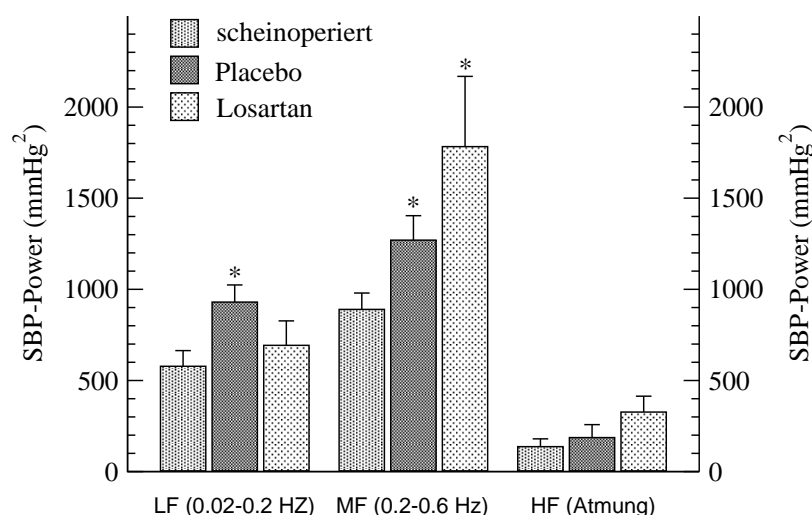
Ein dritter Peak im Frequenzbereich unterhalb der „Mayer-Wellen“ wurde 1939 von Burton identifiziert [23] und von Sayers weiter untersucht [92]. Hyndman und Kitney sahen diesen Peak als Folge zyklischer Schwankungen des peripheren Gefäßwiderstandes auf thermoregulatorische Reize an [57, 63, 64]. Arbeiten der Arbeitsgruppe um R. Cohen maßen dem autonomen Nervensystem im Zusammenspiel mit dem Renin-Angiotensin-System bei der lokalen Blutversorgung und Konstanzhaltung des peripheren Gefäßwiderstandes eher eine Bedeutung bei. Nachfolgende Arbeiten anderer Arbeitsgruppen konnten eine Bedeutung von Stickstoffmonoxid [31, 59], von aus den Nebennieren stammenden Katecholaminen [118] und natriuretischen Peptiden [24] bei der Genese von Blutdruck- und Herzfrequenzschwankungen in diesem Frequenzbereich nachweisen.

Ein Vorteil der Powerspektralanalyse besteht darin, daß die dafür benötigten Signale auf nichtinvasive Art, z.B. der Blutdruck mittels Finapres oder die Herzfrequenz per EKG, gewonnen werden können.

Verschiedene Forschergruppen nutzten die Powerspektralanalyse, um das Powerspektrum von Blutdruck und Herzfrequenz näher zu untersuchen. Anhand dieser mathematischen Methode ließ sich beispielsweise der Einfluß des autonomen Nervensystems auf den Blutdruck und die Herzfrequenz erfassen [1, 15, 24, 84, 105, 106, 107, 108, 112, 113, 121].

Vorhergehende Forschergruppen untersuchten hierbei auch den Einfluß des RAS auf die Oszillationen des Blutdrucks und der Herzfrequenz. Ponchon et al. publizierten 1993 eine Arbeit [87], in der sie experimentell eine renale Hypertonie bei Ratten induzierten. Sie fanden heraus, daß die  $LF_{BP}$ -Power durch eine 1-Clip-2-Kidney Goldblatt-Hypertonie signifikant anstieg.

Dieser Anstieg der  $LF_{BP}$ -Power konnte medikamentös durch eine Behandlung mit Losartan, einem Angiotensin II- $AT_1$ -Subtyp Rezeptor-Blocker, verhindert werden (s. Abb. 1.5).



Ponchon et. al., J. Hypertens. 11 (Suppl. 5):S244-S245, 1993

Abbildung 1.5: Spektralanalyse bei Ratten mit renovaskulärer Hypertonie. Die linken Balken jedes Frequenzbereiches zeigen die systolische Blutdruck (SBP)-Power der scheinioperierten Tiere, die mittleren Balken die der Tiere mit RVH. Die rechten Balken geben Auskunft über die SBP-Power der mit Losartan behandelten Tiere. X-Achse: Frequenzbereich, Y-Achse: spektrale Power des systolischen Blutdrucks. \*:  $p < 0,05$  im Vergleich zu den scheinioperierten Tieren.

Basierend auf dieser und anderen Studien mit ähnlichen Resultaten [3, 41, 88] entwickelte sich die allgemeine Meinung, daß der niederfrequente Bereich des arteriellen Blutdruck-Powerspektrums quasi das Spiegelbild der RAS-Aktivität darstelle.

Bei all diesen Experimenten wurde jedoch nicht berücksichtigt, daß der arterielle Blutdruck durch die Stimulation des RAS erhöht war und die Behandlung mit Losartan dieses hormonelle System zwar blockiert, gleichzeitig aber einen Blutdruckanstieg medikamentös unterdrückt hatte. Im Vorfeld der nachfolgend beschriebenen Versuchsreihen stellte sich die Frage, ob der Anstieg der  $LF_{BP}$ -Power nicht einfach nur die erhöhten Blutdruckwerte widerspiegelt, d.h. nicht unmittelbar auf eine Stimulation des RAS zurückzuführen ist.

## 1.6 Ziele der Studie

Das Hauptziel dieser Arbeit lag in der Klärung der Frage, ob ein Zusammenhang zwischen der  $LF_{BP}$ -Power und der Höhe des Blutdrucks besteht. Aus diesem Grund entwickelten wir ein Studienprotokoll, mit dem sich die Auswirkungen eines stimulierten RAS auf das Powerspektrum unter normotensiven Blutdruckwerten untersuchen ließen. Unter den Bedingungen eines stimulierten RAS und dadurch ausgelöster renovaskulärer Hypertonie sollte der Blutdruck im Gegensatz zu den Untersuchungen von Ponchon et al. durch ein direkt vasodilatatorisch wirksames Pharmakon gesenkt werden und nicht durch eine Substanz, die mit dem RAS interferiert.

Ein weiteres Ziel war es, Untersuchungen zum Longitudinal- und Transversalverlauf des Blutdrucks und der Herzfrequenz durchführen zu können. Deshalb planten wir ein chronisches Experiment, mit dem eine Beurteilung des Blutdruckverlaufs über den gesamten Versuchszeitraum intraindividuell ermöglicht werden sollte. Unterschiedliche Behandlungsgruppen innerhalb eines Tierstammes sollten dazu dienen, den Blutdruck interindividuell vergleichen zu können.

Mit der Untersuchung kinindefizienter Brown-Norway-Katholik-Ratten als zweitem Tierstamm im Vergleich zu Wistar-Kyoto-Ratten sollte der Einfluß des Kallikrein-Kinin-Systems auf das Powerspektrum ermittelt werden.

Ein wichtiger Aspekt der Studienplanung war, die Langzeitwirkungen eines Medikamentes untersuchen zu können. Aus diesem Grund entwarfen wir ein chronisches Experiment mit einer kontinuierlichen medikamentösen Behandlung, bei der die Blutdruck- und Herzfrequenzregistrierungen nicht in unmittelbarem zeitlichen Zusammenhang zu der vorangegangenen Medikamentenapplikation stehen sollten. Im Vordergrund unserer Untersuchungen sollten hierdurch physiologische Adaptationsprozesse stehen, die langfristig durch eine Medikamentenapplikation ausgelöst werden, und nicht kurzfristige Regulationsvorgänge im Rahmen eines Akutversuchs.

Um das Ausmaß der RAS-Aktivierung quantifizieren zu können, planten wir zu verschiedenen Versuchszeitpunkten Blutentnahmen, anhand derer die jeweiligen Reninaktivitäten bestimmt werden sollten. 24-Stunden-Blutdruckmessungen in jeder Versuchsphase sollten klären, ob eine zirkadiane Blutdruckrhythmik unter den verschiedenen experimentellen Bedingungen anzutreffen sei. Weiterhin waren Untersuchungen der Sensitivität des Barorezeptor-Reflexes vorgesehen.

Um die Ergebnisse des Versuchs mit renovaskulärer Hypertonie mit einem weiteren experimentellen Tiermodell vergleichen zu können, wurden in einem Anschlußexperiment doppelt-transgene Sprague-Dawley-Ratten untersucht, die eine vermehrte Aktivität des RAS aufweisen.

# Kapitel 2

## Methoden

### 2.1 Tiere

#### 2.1.1 Tierstämme

Als Versuchstiere wurden einen Monat alte, männliche Wistar-Kyoto-Ratten (WKY), kinindefiziente Brown-Norway-Katholiek-Ratten (BNK) sowie doppelt-transgene Sprague-Dawley-Ratten (SD) verwendet.

Als Charakteristikum weisen BNK-Ratten im Genom beider Kininogene eine Punktmutation von Guanin zu Alanin auf, die zu einer Substitution von Alanin durch Threonin führt. Aus dieser Mutation resultiert die Unfähigkeit, in der Leber synthetisiertes hoch- und niedermolekulares Kininogen in die Blutbahn zu sezernieren. Folge hieraus ist ein Mangel von Kininogenen im Plasma [54]. Während die WKY-Ratten über die Tierzucht Schönwalde GmbH bezogen wurden, stammten die kinindefizienten Brown-Norway-Ratten aus den zentralen Tierlaboratorien der Freien Universität zu Berlin.

Die doppelt-transgenen SD-Ratten wurden von Dr. Bohlender aus der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Luft gezüchtet und uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Bei diesen Tieren handelt es sich um heterozygote Nachkommen einer Kreuzung aus homozygoten männlichen SD-Ratten, die das humane Angiotensinogen (hAOGN) überexprimieren, mit weiblichen SD-Ratten, die homozygot für das humane Renin (hREN) sind. Sie weisen im Vergleich zum Wild-Typ aus dem SD-Tierstamm eine Überaktivität des RAS mit einer ca. 30- bis 50-fach erhöhten Reninaktivität auf. Während die homozygoten Vorfahren normotensive Blutdruckwerte aufweisen, finden sich bei den doppelt-transgenen Tieren mit Mitteldruckwerten von 200 mmHg exzessiv erhöhte Blutdruckwerte. Unbehandelt verläuft die Hypertonie letal: Nach durchschnittlich 55 Tagen versterben die doppelt-transgenen Tiere an den Folgen einer auf einer exzessiven Aktivierung des RAS beruhenden, malignen Hypertonie mit peripheren Organschäden.



### **2.1.2 Tierhaltung**

Die Haltung der Versuchstiere erfolgte individuell in Plastikkäfigen mit einer Größe von circa 30 x 50 cm unter Einhaltung konstanter Temperatur-, Geräusch- und Lichtverhältnisse. Die tägliche Versorgung und Überwachung wurde im zentralen Tierstall des Instituts für Physiologie, Tucholskystraße 02, 10117 Berlin durchgeführt. Die Operationen sowie die postoperative Überwachung von Atmung und Kreislaufverhältnissen erfolgte in den Laborräumen des Physiologischen Instituts. Im weiteren Versuchszeitraum wurden die Tiere dann in den zentralen Tierversuchsanlagen des Tierstalls untergebracht und versorgt. Innerhalb der ersten postoperativen Tage wurden tägliche Kontrollen der Wunden durchgeführt sowie das Gewicht und die Trinkmengen notiert.

Als Nahrung erhielten die Versuchstiere ein ernährungsphysiologisch ausgeglichenes Standardfutter (Purina pellets) sowie Leitungswasser. Beides wurde den Tieren ad libitum angeboten, wobei das Trinkwasser täglich erneuert und das Futter bei Bedarf aufgefüllt wurde.

## **2.2 Operationstechniken**

### **2.2.1 Anästhesie und Operationsvorbereitung**

Um das Anästhetikum gewichtsadaptiert applizieren zu können, wurden die Versuchstiere vor jeder der drei Operationen gewogen und die notwendige Applikationsdosis errechnet. Als Anästhetikum wurde mit Chloralhydrat eine halogenierte Kohlenwasserstoffverbindung in einer Dosierung von 400 mg/kg Körpergewicht verwendet. Die Applikation des Chloralhydrats erfolgte durch intraperitoneale Injektion. Nach Erreichen des gewünschten chirurgischen Toleranzstadiums (Stadium III nach Güdel) wurde das Operationsfeld zur Operationsvorbereitung rasiert und mit 70%-iger Ethanollösung desinfiziert. Durch die gewichtsadaptierte Dosis an Hydralazin ließ sich eine ca. dreistündige Anästhesie erreichen, in deren Zeitraum die Operation meist beendet werden konnte. In Fällen, in denen die Narkosedauer verlängert werden mußte, erhielten die Tiere als Anästhetikum zusätzlich Äther per inhalationem. Hiermit ließ sich die Narkose bis zur Beendigung der Operation verlängern.

### 2.2.2 Implantation des Telemetriesenders

Ausschließlich Tiere mit einem Gewicht zwischen 100 g und 130 g wurden in das Versuchsprotokoll aufgenommen. In einer ersten Operation wurde diesen Tieren ein Telemetriesender (DSI-International) intraaortal implantiert. Nach allgemeinen Operationsvorbereitungen und intraperitonealer Applikation von Chloralhydrat wurden die Tiere nach Erreichen des Narkose-Toleranzstadiums in Rückenlage auf einem als Operationstisch dienenden Holzbrett fixiert. Nach erneuter Desinfektion des rasierten Operationsfeldes wurde die Hautschicht auf einer Länge von ca. 3 cm in kaudokranieler Schnittführung eröffnet. Nach stumpfer Präparation von Hautschicht und darunterliegender Abdominalmuskulatur wurde das Abdomen mittels Längsinzision durch die Mm. recti abdomini eröffnet, wobei sich die Schnittführung entlang der Linea alba orientierte.

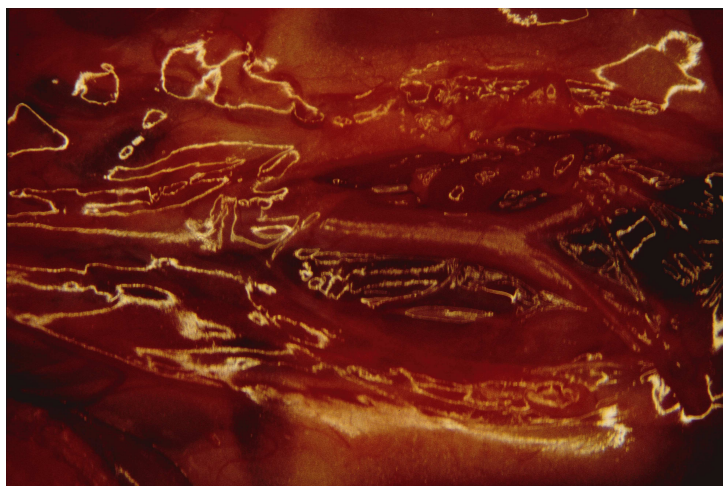


Abbildung 2.1: Operationssitus mit freipräparierter Aorta abdominalis

Danach wurde das Operationsgebiet dargestellt (s. Abb. 2.1), wobei mit physiologischer Kochsalzlösung angefeuchtete Gewebetücher dazu dienten, die Darmschlingen am Rande des Operationsfeldes zu halten. Zur Fixierung wurden vier Wundhaken an den Gewebetüchern und Mm. recti befestigt und aufgespannt. Nach Darstellung des abdominellen Verlaufs der Aorta erfolgte eine Spaltung der Gewebefaszien zwischen abdomineller Aortenbifurkation und Abgang der Nierenarterien durch stumpfe Präparation und Zuhilfenahme von Tupfern. Unter Schonung beider Ureteren wurde die Aorta kaudal der Nierengefäße mobilisiert und mit gebogenen Pinzetten von der Vena cava inferior getrennt. Um die Durchblutung der Aorta bei der sich anschließenden Punktion temporär unterbinden zu können, wurde eine Ligatur um die Aorta geschlungen.

Durch einen kranialwärts gerichteten Zug an der Ligatur wurde die Aorta für etwa zehn Sekunden aufgespannt und der distale Blutfluß kurzzeitig unterbrochen. Unter Verwendung einer rechtwinklig gebogenen Kanülenspitze erfolgte eine Punktion der Aorta in Höhe der Bifurkation (s. Abb. 2.2).

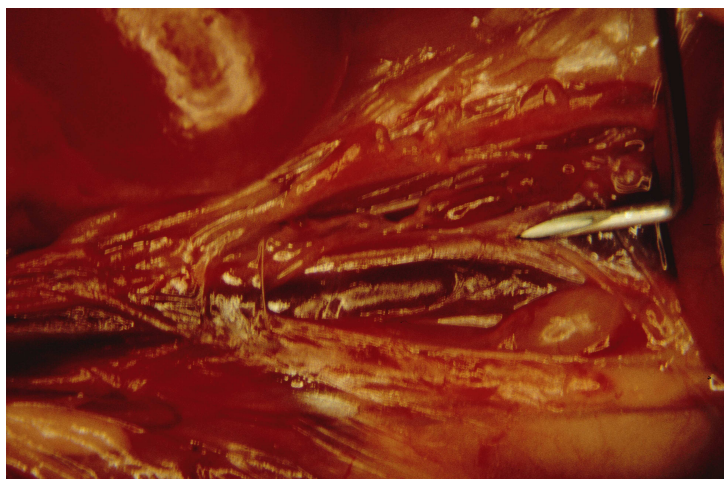


Abbildung 2.2: Punktion der Aorta

Unter Verwendung gefäßchirurgischer Pinzetten wurde die Punktionsstelle aufgedehnt (s. Abb. 2.3).

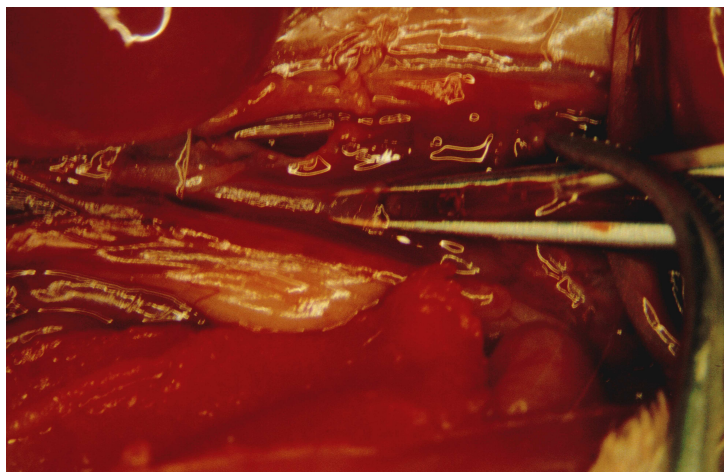


Abbildung 2.3: Aufdehnung der Punktionsstelle

Hierdurch konnte die Katheterspitze des zu implantierenden Telemetriersenders intraaortal bis kaudal der Nierenarterien vorgeschoben werden.

Nach Überprüfung einer korrekten Position der Katheterspitze wurde der Katheter mittels Histoacryl<sup>R</sup>-Gewebekleber unter gleichzeitigem Verschluß der Punktionsstelle an der Aorta fixiert (s. Abb. 2.4).

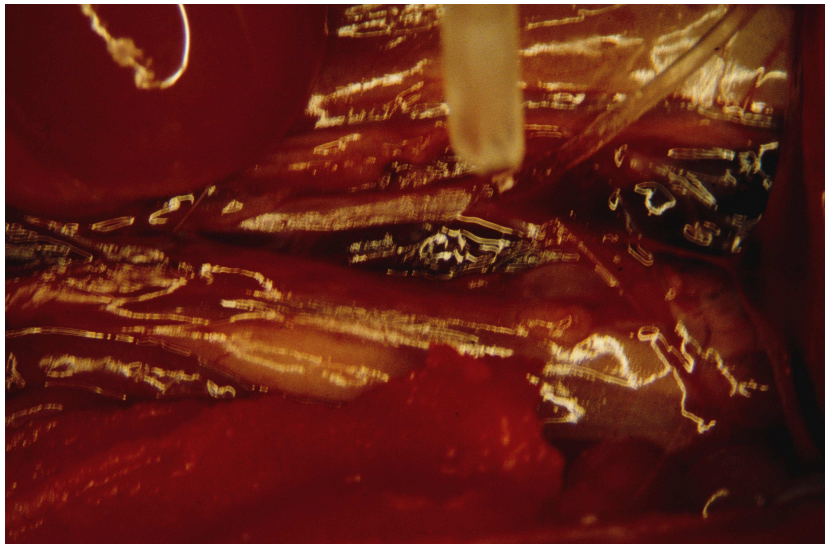


Abbildung 2.4: Fixierung des Katheters

Nach kurzer Einwirkzeit konnte die Ligatur gelöst und die Perfusion in der abdominalen Aorta wieder freigegeben werden. Nach Entfernung der Gewebetücher und Wundhaken aus dem Operationsfeld wurde der Telemetriesender unter postoperativer breitbandantibiotischer Abschirmung (50 mg Ampicillin pro kg Körpergewicht) mit der Bauchmuskulatur vernäht und die Operation mit der Hautnaht abgeschlossen.

### 2.2.3 Implantation des Nierenarterienclips

Nach Aufzeichnung des Blutdrucks unter Referenzbedingungen innerhalb der ersten drei Wochen erfolgten in den darauffolgenden drei Wochen nach randomisierter Aufteilung der Versuchstiere in eine Kontroll- und eine Hydralazin-Gruppe Registrierungen von Blutdruck und Herzfrequenz unter Bedingungen mit stimuliertem Renin-Angiotensin-System.

Um das Renin-Angiotensin-System zu aktivieren wurde eine Methode angewendet, wie sie erstmalig von Goldblatt 1934 beschrieben worden war [43]. Nach erfolgter Anästhesie wurde die linke Flanke der Versuchstiere rasiert, desinfiziert und die Haut mit einem ca. 2 cm großen Längsschnitt über der linken Regio hypochondriaca eröffnet. Nach Durchtrennung von Teilen der autochthonen Rückenmuskulatur wurde das Retroperitoneum etwa einen Querfinger kranial der linken Spina iliaca superior eröffnet. Das retroperitoneale Fettgewebe wurde mittels stumpfer Präparation von der angrenzenden Psoasmuskulatur abgetrennt. Unter Verwendung feiner, gebogener Pinzetten wurden die Nierengefäße dargestellt und anschließend die Nierenarterie von der Nierenvene und umgebenden Faszien-schichten abpräpariert.



Abbildung 2.5: Situs mit aufgespannter Nierenarterie

Um den zu applizierenden Silberclip über der Nierenarterie vorschieben zu können, wurde die Nierenarterie zwischen den Branchen der Pinzette aufgespannt (s. Abb. 2.5).



Hierdurch ließ sich der Silberclip mit einem inneren Durchmesser von  $0.2\text{ }\mu\text{m}$  [86] problemlos über die Nierenarterie schieben (s. Abb. 2.6).

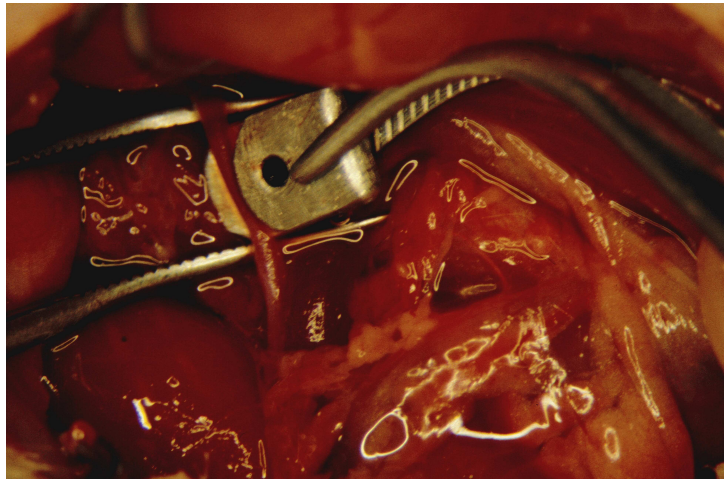


Abbildung 2.6: Implantation des Nierenarterienclips

Besonderes Augenmerk wurde darauf gelegt, daß sich der Clip möglichst nahe am Abgang der A. renalis von der Aorta abdominalis befand.



Abbildung 2.7: Lage des Nierenarterienclips

Abbildung 2.7 zeigt die typische Position eines Nierenarterienclips in Aortennähe.

Um zu garantieren, daß sich die Position des Silberclips während der sich anschließenden dreiwöchigen Clipphase nicht verändern konnte, wurde seine Lage mit Hilfe eines durch den Clip laufenden Fadens abgesichert (s. Abb. 2.8).

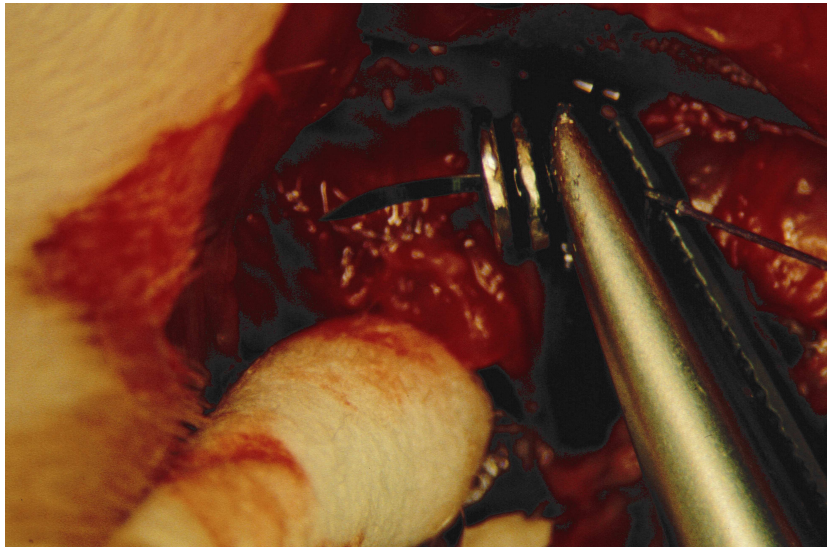


Abbildung 2.8: Fixierung des Clips

Nach der Entfernung der verwendeten Tupfer aus dem Operationsgebiet wurde die durchtrennte Muskulatur mit einer fortlaufenden Naht verschlossen und die Operation mit dem Vernähen der die Muskulatur bedeckenden Hautschicht beendet.

### 2.2.4 Explantation des Nierenarterienclips

Die Anästhesie dieses letzten operativen Eingriffes erfolgte wie schon bei den beiden vorangegangenen Operationen durch intraperitoneale Gabe von Chloralhydrat. Nach der Rasur und Desinfektion der linken Flanke wurde erneut der zuvor bei der Implantation des Clips beschriebene Operationsweg gewählt.

Unter Darstellung von Niere und Nierengefäßen erfolgte die Freipräparation des eingewachsenen und mit Faszien-schichten bedeckten Clips. Nach Eröffnung der Faszien-schichten und Durchtrennung des den Clip fixierenden Fadens ließ sich der Clip von der Nierenarterie entfernen (s. Abb. 2.9).



Abbildung 2.9: Explantation des Nierenarterienclips

Nach der Explantation des Nierenarterienclips, dem Verschuß der zuvor eröffneten Muskelschicht und der Naht der Hautränder wurde der Eingriff beendet.



### 2.2.5 Implantation von venösen und arteriellen Gefäßkathetern

Den doppelt-transgenen Sprague-Dawley-Ratten wurden am Tage vor dem Versuch je ein Gefäßkatheter in die A. und V. femoralis implantiert. Verwendet wurden hierfür 20 cm lange Polypropylenschläuche (PP 25, Portex, London/UK) mit einem Innendurchmesser von 0.4 mm und einem Außendurchmesser von 0.8 mm. Die Tiere wurden mit Chloralhydrat (400 mg/kg KG i.p.) narkotisiert.

Die narkotisierten Tiere wurden über der rechten Leiste und im Nacken rasiert und die Haut mit 70%-igem Äthylalkohol desinfiziert. In Rückenlage wurden die Ratten mit abduzierten Extremitäten auf einem Brett fixiert und die Hautschicht in der rechten Leistenbeuge mittels einer 1-2 cm langen Inzision eröffnet. Die Femoralgefäße und der begleitende N. femoralis wurden unter stumpfer Präparation vom subcutanen Fettgewebe getrennt. Mit einer gebogenen Pinzette wurden die Gefäße unter besonderer Schonung des Nerven isoliert und dargestellt. Zuerst erfolgte die Katheterimplantation in die Vene. Hierfür wurde die Vene kranial und kaudal von zwei Ethibond<sup>R</sup>-Fäden unterlegt. Durch Zug am proximal gelegenen Faden wurde das Gefäß gestaut und der distale Gefäßabschnitt durch den zweiten Faden ligiert. Das zwischen beiden Fäden aufgespannte Gefäß wurde mit einer Gefäßschere eröffnet und mit den Branchen einer spitzen Gefäßpinzette aufgespreizt. Der mit heparinisierter Kochsalzlösung gefüllte Katheter wurde ca. 3-4 cm kranialwärts in das Gefäßlumen vorgeschoben und mit den beiden Fäden fixiert. Das Ende des Katheters befand sich somit in der V. cava. In ähnlicher Weise wurde der zweite Katheter in die A. femoralis eingebracht. Im Unterschied zur Vene wurde hier aber zunächst das distale Ende ligiert, um so eine Stauung der Arterie proximal der Ligatur zu erreichen. Der Katheter wurde in der Aorta abdominalis soweit vorgeschoben, daß sich die Katheterspitze distal des Abgangs der Nierenarterien befand. Die korrekte Lage wurde durch den pulsierenden Rückfluß von Blut im Katheter festgestellt.

Beide Katheter wurden mit 0.2 ml heparinisierter Kochsalzlösung gespült und mit kleinen Metallstiften verschlossen. Die Katheter wurden unter der Haut zur Nackenregion getunnelt und dort durch eine 1 cm breite Querinzision nach außen geführt. An der Stelle des Austritts wurden die Katheter mit farbigem Isolierband gekennzeichnet (Vene blau, Arterie rot) und mit der Nackenhaut vernäht. In der Leistenregion beschrieben beide Katheter einen weiten Bogen, um dadurch Zugkräften, die bei Bewegungen der Tiere auftreten, entgegenzuwirken. Nach Verschuß der eröffneten Hautregion in der Leiste mit einer fortlaufenden Naht wurde die Operation beendet und die Tiere unter Beobachtung bis zum Erwachen aus der Narkose unter einer Infrarotlampe vor Auskühlung geschützt.

## 2.3 Hämodynamik

### 2.3.1 Telemetrische Blutdruck- und Herzfrequenzmessungen

Das DSI PhysioTel<sup>R</sup> Telemetriesystem [33] ermöglichte die Aufzeichnung von sich frei in ihrem Käfig bewegenden Tieren. Die Registrierung des Blutdrucks erfolgte somit telemetrisch am wachen und ruhenden Tier.

Um die Batterieleistung des implantierten Telemetriesenders (TL11M2-C50-PXT, Data Sciences, St. Paul/USA, s. Abb. 2.10) zu schonen, konnte der Sender mit Hilfe eines Magneten von außen an- und ausgeschaltet werden.

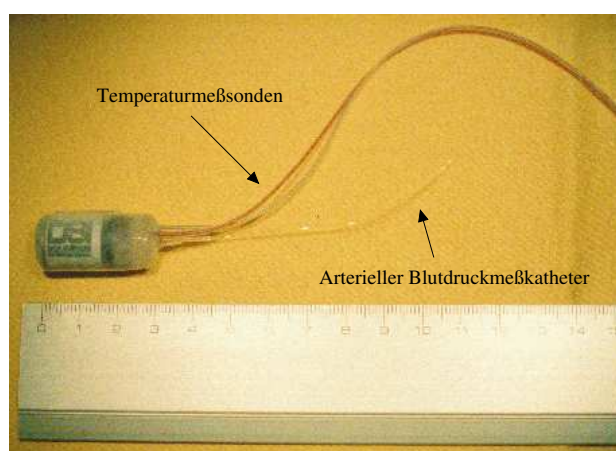


Abbildung 2.10: Telemetriesender

Nach Aktivierung des Senders wurden die Tiere mit ihren Käfigen auf eine etwa gleichgroße Meßplatte (RLA1020; Data Sciences) gestellt. Die von der Meßplatte empfangenen digitalen Meßsignale wurden über eine Wandlerkarte (BCM 100, Data Sciences) einem A/D-Wandler (UA10, Data Sciences) zugeführt. Die in analoge Signale umgewandelten Daten des UA10 konnten unter Verwendung eines im Labor entwickelten Meßwerterfassungsprogramms XmAD [102] auf dem Monitor dargestellt werden. Die Abtastrate bei den Messungen betrug 500 Hz.

Mit den Registrierungen wurde so lange gewartet, bis sich die Tiere in ruhendem Zustand befanden. Am Ende der knapp dreiminütigen Registrierphase wurden die aufgezeichneten Blutdruck- und Herzfrequenzkurven auf der Festplatte des Meßcomputers gespeichert und umgehend über ein ebenfalls im Labor des Physiologischen Instituts entwickeltes Datenauswertprogramm XmAna [104] angesehen und auf Störsignale und Artefakte hin beurteilt.

## **2.4    Ermittelte Parameter**

### **2.4.1    Trinkmenge**

Da die Versuchstiere während des gesamten Versuchsprotokolls in Einzelkäfigen untergebracht waren, konnte die tägliche Trinkmenge jedes Tieres näherungsweise durch tägliches Wiegen der Trinkflaschen ermittelt werden. Um hierbei jeweils einen Zeitraum von ca. 24 Stunden erfassen zu können, wurden die Wasserflaschen täglich zwischen 8:00 und 9:00 Uhr gewogen. Aus der Differenz zwischen aktuellem Flaschengewicht und Gewicht des Vortages wurde die am zurückgelegten Tag aufgenommene Trinkmenge errechnet. Um das Trinkverhalten während der drei Protokollphasen miteinander vergleichen zu können, wurde aus den täglichen Trinkmengen jeweils einer Woche das arithmetische Mittel gebildet.

### **2.4.2    Körpergewicht**

Das Wiegen der Tiere zur Bestimmung des Körpergewichtes erfolgte täglich zwischen 8:00 und 9:00 Uhr zusammen mit der Trinkwasserbestimmung. Aus dem jeweils gemessenen Körpergewicht wurde über den gesamten Versuchszeitraum das arithmetische Mittel für jede einzelne Woche berechnet.

### **2.4.3    Hydralazin-Dosierung**

In der Gruppe, die während der Phase mit stimuliertem RAS mit Hydralazin behandelt wurde, richtete sich die täglich zu applizierende Hydralazin-Dosis nach den zuletzt registrierten Blutdruckwerten und dem aktuellen Gewicht (y) der Tiere. Als Ausgangskonzentration wurde eine in der Literatur zur Blutdrucksenkung angegebene Hydralazin-Dosierung von täglich 40 mg Hydralazin pro Kilogramm Körpergewicht [46] gewählt.

Die täglich zu applizierende Hydralazindosis wurde anhand des aktuellen Körpergewichts täglich ermittelt. Hierfür diente Hydralazin in einer Konzentration von 4 g pro 100 ml destilliertem Wasser als Stammlösung.

Die zu applizierende ml-Anzahl an Stammlösung (x) betrug somit

$$x = \frac{1}{40} \times \frac{4}{100} \times \text{Körpergewicht}[g] \text{ ml}$$

und entsprach dem Tausendstel des in Gramm angegebenen Körpergewichtes.

Die Applikation dieser Dosis erfolgte täglich per Gavage am wachen Tier. Reichte die anfängliche Hydralazin-Dosis von täglich 40 mg/kg Körpergewicht nicht aus, den Blutdruck suffizient auf das Referenzniveau aus der ersten Kontrollphase zu senken, so wurde die Hydralazin-Dosis sukzessive erhöht.

#### 2.4.4 Reninbestimmung (Angiotensin I RIA)

Das proteolytisch wirksame Enzym Renin wird in den juxtaglomerulären Zellen der Nieren gebildet. Adäquate Stimuli, die seine Freisetzung fördern, sind neben einem Abfall des intrarenalen Blutdrucks vor allem eine  $\beta_1$ -adrenerge Stimulation sowie ein Mangel von Natrium im Plasma [51].

Renin katalysiert die Bildung des Dekapeptids Angiotensin I aus seinem Vorläufermolekül Angiotensinogen. Unter dem Einfluß des Konversionsenzyms (ACE) und Abspaltung eines Dipeptids wird das biologisch aktive Oktapeptid Angiotensin II gebildet. Angiotensin II führt neben einer potenten Vaso-  
konstriktion zu einer Ausschüttung des Mineralokortikoids Aldosteron aus der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde (NNR). Aldosteron seinerseits steigert die tubuläre Resorption von  $\text{Na}^+$  und Wasser und fördert die Sekretion von  $\text{K}^+$  und  $\text{H}^+$ . Hierdurch bewirkt Aldosteron eine Erhöhung des extrazellulären Flüssigkeits- und Natriumbestands.

##### Prinzip

Das Prinzip der plasmatischen Reninaktivitätsbestimmung (PRA) beruht auf einer quantitativen radioimmunologischen Messung des pro Zeiteinheit im Plasma gebildeten Angiotensin I (Angiotensin I RIA) [42, 45, 73].

Für die PRA-Bestimmung wurden zunächst Standardkurven von Angiotensin I-Proben bekannter Konzentration erstellt, anhand derer sich die Angiotensin I-Spiegel der zu untersuchenden Proben ermitteln ließen. In Abhängigkeit von der Inkubationszeit wurde schließlich die entsprechende plasmatische Reninaktivität berechnet.

### Plasmagewinnung

Die Bestimmung der Reninaktivität im Plasma erfolgte aus mit  $\text{Na}^+$ -EDTA anti-koagulierte Blut. Der Vorteil von  $\text{Na}^+$ -EDTA gegenüber Heparin liegt darin begründet, daß die Bildung von Angiotensin I durch  $\text{Na}^+$ -EDTA im Gegensatz zum Heparin nicht gehemmt und gleichzeitig das Konversionsenzym blockiert wird. Durch Zentrifugation mit 2000 g ließ sich das Plasma von den zellulären Bestandteilen trennen. Hämolytische Proben wurden von der Studie ausgeschlossen.

### Angiotensin I Bildung

Um die Empfindlichkeit der Proben gegenüber niedrigen Reninkonzentrationen zu erhöhen, wurde ein pH-Wert von 6.0 mit einem speziellen Reaktionspuffer eingestellt. Durch dieses Milieu wurden optimale Bedingungen für die Bildung von Angiotensin I geschaffen.

Um diese Versuchsbedingungen zu erreichen wurden folgende Reagenzien in unbeschichtete Röhrchen pipettiert:

- 500  $\mu\text{l}$  Probe
- 10  $\mu\text{l}$  Phenylmethylsulfonyl-Fluorid-Lösung (PMSF, Enzymhemmer)
- 50  $\mu\text{l}$  Reaktionspuffer

Nach vorsichtigem Vermischen der Lösungen wurde jede Probe in zwei Ansätze zu je 200  $\mu\text{l}$  aufgeteilt. Ein Ansatz bildete den Probenleerwert und wurde umgehend auf Eis gestellt. Der zweite Ansatz diente der Probenbestimmung und wurde bei einer Temperatur von 37° C für 30 Minuten im Wasserbad inkubiert.

### Testdurchführung

Alle für die Durchführung der PRA-Bestimmung benötigten Reagenzien wurden vor ihrem Gebrauch vorsichtig auf Raumtemperatur von 20-25° C gebracht. Im Anschluß wurden je 50  $\mu\text{l}$  der Standardlösung, 50  $\mu\text{l}$  der Proben und 50  $\mu\text{l}$  der Probenleerwerte mit 500  $\mu\text{l}$  Tracer bei Raumtemperatur in vorgefertigten Röhrchen inkubiert, deren Innenfläche mit einem Kaninchen-Antiserum gegen Angiotensin I-Konjugat beschichtet war. Nach Ablauf von 24 Stunden wurden die Inkubationsmischungen vorsichtig aus den Röhrchen abgesaugt und die Radioaktivität des verbliebenen, an die Röhrchen gebundenen und mit  $^{125}\text{I}$ -markierten Angiotensin I gemessen.

### Ergebniskalkulation

Durch Division der Proben- bzw. Standardwerte durch den Nullstandard wurden im ersten Schritt genormte Nettozählraten ( $x$ ) berechnet, deren Angabe in Prozent ( $\times 100$ ) erfolgte:

$$x = \frac{\text{mittlere Zählrate der Proben oder Standards}}{\text{mittlere Zählrate des Nullstandards}} \times 100$$

Aus dieser Standardkurve ließen sich die Angiotensin I-Konzentrationen der Proben (Inkubation bei 37° C) sowie der Probenleerwerte (Inkubation bei 4° C) ermitteln. Die Plasma-Reninaktivität (PRA) berechnete sich in Abhängigkeit von der Inkubationszeit durch Subtraktion der Angiotensin I-Konzentrationen der Probenleerwerte von denen der Proben und anschließender Multiplikation des Wertes mit einem Verdünnungsfaktor von 1.12:

$$PRA = \frac{(ng\ 37^\circ C - ng\ 4^\circ C) \times 1.12}{\text{Inkubationsstunden}} [ng/mL/h]$$

### 2.4.5 Barorezeptor-Reflex

Das in der Einleitung bereits vorgestellte Verfahren von G. Bertinieri, das spontan auftretende Blutdruck- und Herzfrequenzsequenzen ausnutzt, bei denen sowohl Blutdruck und Pulsintervall zunehmen („up“-Sequenzen) oder abnehmen („down“-Sequenzen), diene in dieser Arbeit zur Beurteilung des BRR.

Die hierfür verwendeten „up“- und „down“-Sequenzen konnten offline aus den registrierten Blutdrucksignalen mit Hilfe des im Labor entwickelten Datenauswerteprogramms XmAna [104] erfaßt und die Steigung der Regressionsgeraden berechnet werden. Hierbei wurden nur „up“- und „down“-Sequenzen mit einem Korrelationskoeffizienten ( $r$ )  $> 0.85$  in die Berechnung einbezogen.

Anhand der Mittelwerte sämtlicher Steigungen aller „up“- und „down“-Sequenzen ließ sich die Sensitivität des Barorezeptor-Reflexes ermitteln.

## 2.5 Autoregressive Powerspektralanalyse

Bei der Berechnung des Powerspektrums stehen mit der sogenannten „fast Fourier Transform“ (FFT) und der autoregressiv berechneten Powerspektralanalyse zwei unterschiedliche Methoden zur Verfügung [83]. Beide Methoden ergeben bei korrekter Anwendung vergleichbare Ergebnisse [81].

In dieser Arbeit wurde die autoregressive Methode zur Berechnung der Powerspektren verwendet, die Mitte der achtziger Jahre von M. Pagani in die klinische Forschung eingeführt wurde [78]. Diese Methode basiert auf den folgenden Prinzipien:

Variabilitätssignale sind von Natur aus pseudo-zufällig und können als stochastischer Prozeß  $y(k)$  aufgefaßt werden, der das Ergebnis eines zeitlich konstanten Systems ist, das durch Störsignale  $w(k)$  gesteuert wird.

$$w(k) \longrightarrow \boxed{H(z)} \longrightarrow y(k)$$

Hierbei ist  $H(z)$  die Transferfunktion der komplexen Variable  $z$ , die quantitativ bestimmt und als Modell des signal-generierenden Mechanismus verwendet wird.

Eine einfache Beschreibung der Eingangs-/Ausgangs-Beziehung wird durch die folgende autoregressive Formel beschrieben

$$y(k) = \sum_{i=1}^p a(i)y(k-1) + w(k)$$

bei der  $a(i)$  die  $p$  unbekannten Parameter sind. Komplexere Modelle sind durch Box und Jenkins [17] beschrieben worden. Demnach ergibt sich

$$H(z) = \left( 1 - \sum_{i=1}^p a(i) * z^{-i} \right)^{-1}$$

was die Transferfunktion mit den Koeffizienten  $a(i)$  in Beziehung setzt.

Im Rahmen der autoregressiven Berechnung wird der Vektor  $\theta$  der Koeffizienten  $a(i)$  bestimmt.

$$\theta = \left[ a(1), a(2), a(3) \dots a(p), \lambda^2 \right]$$

Nach Bestimmung des Vektors  $\theta$  kann die Powerspektraldichte (PSD) anhand der Funktion  $P(f)$  abgeschätzt werden,

$$P(f) = \lambda^2 / \left| 1 - \sum_{i=1}^p a(i) e^{-j2\pi f i} \right|^2$$

wobei  $f$  die Frequenz symbolisiert. Die hieraus resultierende PSD erfüllt das Kriterium der größtmöglichen Entropie und bietet gegenüber der auf der herkömmlichen Methode basierenden, klassischen Fourier Analyse einige Vorzüge. Zu nennen sind vor allem konsistente und geglättete Näherungen des Spektrums, die unabhängig von der Anzahl der Datenpunkte sind.

Es wurden hier zur Berechnung der Spektren 1000 aufeinanderfolgende Herzaktionen verwendet. Die Anzahl der Parameter  $a(i)$  wurde auf 30 festgelegt.





Nach drei Wochen unter Referenzbedingungen folgte die Phase mit stimuliertem Renin-Angiotensin-System. Im Rahmen der hierfür erforderlichen Clipimplantation wurde den anästhesierten Tieren vor der Operation Blut aus dem retroorbitalen Venenplexus entnommen, um die plasmatische Reninaktivität (PRA) unter Referenzbedingungen bestimmen zu können. Die Blutproben wurden in mit  $\text{Na}^+$ -EDTA benetzten Eppendorf-Gefäßen gesammelt und sofort nach Ihrer Gewinnung bei  $-80^\circ \text{C}$  bis zum Zeitpunkt der Aktivitätsbestimmung schockgefroren.

Im Anschluß an die Blutentnahme wurde den Tieren zur Aktivierung des RAS ein Silberclip um die linke Nierenarterie plaziert. Um Aussagen über den Einfluß des Renin-Angiotensin-Systems auf das Powerspektrum des Blutdrucks unabhängig vom Blutdruckniveau treffen zu können, wurden zwei Behandlungsgruppen gebildet und untersucht. Hierfür erfolgte eine randomisierte Zuteilung der Tiere in eine der beiden Behandlungsgruppen: Ein mit Placebo behandelter Versuchsarm diente als Kontrollgruppe, während die andere Behandlungsgruppe einer täglichen Behandlung mit Hydralazin in einer Ausgangsdosis von 40 mg pro Kilogramm Körpergewicht zugewiesen wurde. Ziel dieser zwei Behandlungsgruppen war es, den Einfluß des Renin-Angiotensin-Systems auf das Powerspektrum von Blutdruck und Herzfrequenz sowohl unter hyper- als auch unter normotensiven Blutdruckwerten untersuchen zu können. Nach einer einwöchigen, postoperativen Erholungsphase wurden hierzu Blutdruck und Herzfrequenz wiederum alle zwei Tage am wachen Tier aufgezeichnet. Gegen Ende dieser Phase mit stimuliertem Renin-Angiotensin-System erfolgte erneut eine 24-h-Blutdruckaufzeichnung. Bevor der Silberclip wieder explantiert wurde, erfolgte eine zweite Blutentnahme, um die Reninaktivität unter stimuliertem RAS quantifizieren zu können. Gleichzeitig mit der Clipexplantation endete die medikamentöse Behandlung.

Im letzten Zeitabschnitt des Protokolls wurden Blutdruck und Herzfrequenz unter den Bedingungen eines sich normalisierenden Renin-Angiotensin-Systems erneut alle zwei Tage aufgezeichnet. Zwei Tage vor Beendigung des Experiments wurde eine abschließende 24-h-Blutdruckmessung aufgezeichnet. Bei Versuchsende erfolgte eine letzte Blutentnahme und die Tiere wurden mittels einer Überdosis an Chloralhydrat eingeschläfert.

Durch dieses Protokoll war es möglich, die Effekte eines stimulierten Renin-Angiotensin-Systems auf das Powerspektrum des BP und der HF unabhängig von der Höhe des Blutdrucks zu untersuchen.

## 2.6.2 Powerspektralanalyse bei doppelt-transgenen Ratten

Um die Auswirkungen einer durch eine verstärkte Aktivität des RAS bedingten Hypertonie auf das Powerspektrum von Blutdruck und Herzfrequenz an einem weiteren Tiermodell untersuchen zu können, wurden in einem Anschlußexperiment doppelt-transgene Sprague-Dawley-Ratten verwendet, die eine Überexpression des humanen Renins (hRen) und des humanen Angiotensinogens (hAOGEN) aufweisen [16, 40].

Einen Tag vor Beginn der eigentlichen Blutdruckmessungen wurden den Versuchstieren dieses Protokolls zwei Katheter implantiert. Ein intraarterieller Katheter in der A. femoralis diente der invasiven Blutdruckmessung. Über den in der V. femoralis gelegenen Katheter konnten intravenöse Injektionen appliziert und Infusionsbehandlungen durchgeführt werden.

Am Versuchstag wurden die Tiere nach initialer Kalibrierung der Blutdruckmeßanlage an diese angeschlossen. Hierfür wurde der über den Nacken nach außen geführte arterielle Katheter aus der A. femoralis stumpf abgeklemmt und das zugeschweißte Ende abgeschnitten. Nach dem Anschluß an einen Druckwandler wurde die Klemme wieder entfernt. Mit dem Beginn des Experimentes und der Aufzeichnung der Meßreihen wurde eine halbe Stunde gewartet, so daß die Tiere genügend Zeit hatten, sich an die Meßsituation zu gewöhnen. Zum Zeitpunkt der Registrierungen befanden sich die Tiere in ruhendem Zustand.

Das Versuchsprotokoll dieser zweiten Versuchsreihe (s. Abb. 2.12) läßt sich in zwei Meßphasen aufteilen:

### Kontrollphase (8 Minuten)



### Infusion von NaNP (100 µg /ml) (6 Minuten)

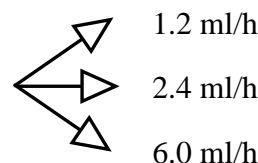


Abbildung 2.12: Protokoll transgene Ratten

Zu Beginn der Messungen erfolgte eine achtminütige Blutdruckmessung unter Ruhebedingungen (Kontrollphase).

Die darauffolgende Phase mit intravenöser Infusion von Natrium-Nitroprussid (NaNP) in steigender Konzentration ( $100\mu\text{g NaNP}$  à 1.2, 2.4 und 6.0 ml/h) diene dazu, den Blutdruck der doppelt-transgenen Versuchstiere auf das Referenzniveau des Wild-Typs zu senken, um hierdurch die Auswirkungen einer akuten Blutdrucksenkung auf das Powerspektrum bei aktiviertem Renin-Angiotensin-System untersuchen zu können.

Die aufgezeichneten Blutdruck- und Herzfrequenzsignale wurden gespeichert und offline mit Hilfe des Datenauswerteprogramms XmAna [104] unter Verwendung einer Fourier-Transformation in ihre entsprechenden Frequenzanteile zerlegt. Hierbei wurde die absolute und relative Power für den LF- (0.02-0.2 Hz), MF- (0.2-0.6 Hz) und HF-Bereich (1 Hz) berechnet.

## 2.7 Geräte und Materialien

### 2.7.1 Geräte

**Operationsbesteck** (s. Abb. 2.13) Firma: Aesculap

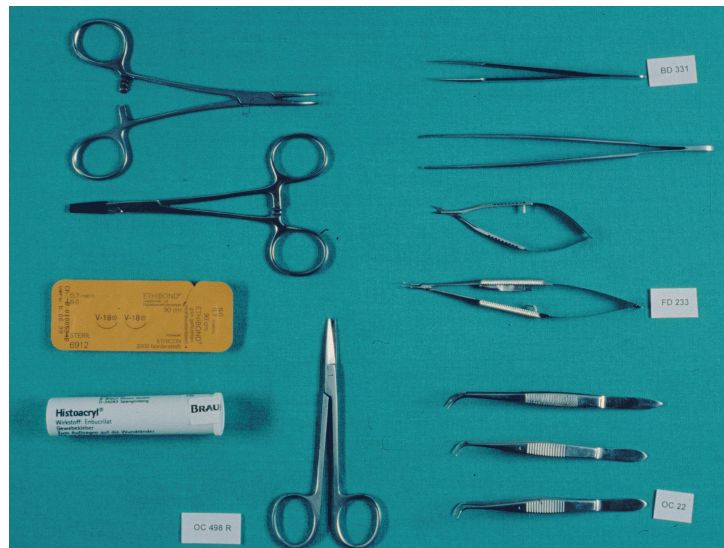


Abbildung 2.13: Operationsbesteck

**Operationsmikroskop** Firma: Leica, Vergrößerung 6.3- bis 40-fach

**Telemetrische Blutdruckmeßanlage** Firma: Data Science International

### 2.7.2 Pharmaka

**Ampicillin** Binotal<sup>R</sup>, Trockensubstanz für Infusionslösung, Firma: Bayer

**Äthanol per Inhalationem** Diethyether<sup>R</sup>, Firma: Merck

**Chloralhydrat** Chloraldurat<sup>R</sup>, Firma: Pohl Boskamp

**Heparin** Heparin Vitrium 25000<sup>R</sup>, Firma: Ratiopharm

**Hydralazin** Docidrazin<sup>R</sup>, Firma: Astra Zeneca

**Methoxamin Hydrochlorid** Methoxamin<sup>R</sup>, Firma: Sigma

**Natriumnitroprussid (NaNP)** Nipruss<sup>R</sup>, Firma: Schwarz Pharma

**RENCTK-Kit zur Reninaktivitätsbestimmung** Firma: DiaSorin, bestehend aus:

- $^{125}$ Iod-markiertes Angiotensin I
- Angiotensin I-Standards
- beschichtete Röhrchen
- Pufferlösung (pH 6.0)
- Enzyminhibitor: Phenylmethylsulfonyl-Fluorid (PMSF)
- Kontrollplasma

### 2.7.3 Verbrauchsmaterial

**Faden für Gefäßligaturen** Ethibond<sup>R</sup> Stärke 6-0, Firma: Ethicon

**Gewebekleber** Histoacryl<sup>R</sup>

**Polypropylenschlauch PP 25** Innendurchmesser 0.4 mm, Außendurchmesser 0.8 mm, Firma: Portex

**Silberclip** Innendurchmesser 0.2  $\mu\text{m}$  – Anfertigung in der Feinmechanikwerkstatt der Charité

## 2.8 Statistik

Die Auswertung der gewonnenen Meßergebnisse erfolgte mit dem Statistikprogramm XmStat [103].

Von allen ermittelten Daten wurden die arithmetischen Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardfehlern berechnet. Als Irrtumswahrscheinlichkeit  $\alpha$  galt für alle angewendeten statistischen Tests der Wert  $\alpha = 0.05$ , d.h. p-Werte kleiner als 5 % erlaubten eine Verwerfung der Nullhypothese. Um Tierstämme und Behandlungsgruppen miteinander vergleichen zu können, wurde der Student's t-Test für unabhängige Gruppen verwendet. War es entscheidend, ob sich Meßwerte innerhalb einer Meßreihe statistisch voneinander unterscheiden, wurde eine 1-Weg-Varianzanalyse (one-way ANOVA) für wiederholte Messungen durchgeführt. Als post-hoc Tests im Falle einer Signifikanz dienten Scheffé-, Tukey-, N-Keuls- und Fisher-Test. Um überprüfen zu können, ob die unterschiedliche Behandlung einen Einfluß auf den Verlauf über die drei Phasen besaß, wurde eine 2-Weg-Varianzanalyse (two-way ANOVA) angewandt.

# Kapitel 3

## Ergebnisse

### 3.1 Überlebenszeiten

#### 3.1.1 Powerspektralanalyse bei stimuliertem RAS

Insgesamt wurden 111 Tiere in das erste Versuchsprotokoll aufgenommen. Tabelle 3.1 stellt die in die einzelnen Protokollphasen eingeschlossenen Versuchstiere zusammen:

Tierstamm	Kontrollphase 1	Behandlung	Clipphase	Kontrollphase 2
Wistar	37 (25)	Placebo	14 (14)	14 (14)
		Hydralazin	11 (8)	8 (8)
BNK	74 (44)	Placebo	16 (9)	9 (8)
		Hydralazin	28 (9)	9 (9)
Gesamt	111 (69)		69 (40)	40 (39)

Tabelle 3.1: Anzahl der in das Protokoll eingeschlossenen Versuchstiere. Die vor den Klammern stehenden Zahlen geben Auskunft über die absolute Zahl der in die Phase eingeschlossenen Tiere, die in den Klammern stehende Zahl gibt die Anzahl der Tiere wieder, welche die jeweilige Phase erfolgreich abgeschlossen haben.

Von den 111 Tieren stammten 37 Tiere aus dem Wistar- und 74 aus dem Brown-Norway-Katholik-Tierstamm. In der Wistar-Gruppe überlebten 25 der 37 Tiere (67.6 %) die erste Protokollphase (Implantation des Telemetriesenders) im Gegensatz zu 44 der 74 Versuchstiere (59.5 %) des BNK-Tierstammes. Haupttodesursache während dieser Phase waren vor allem nicht beherrschbare arterielle Blutungen im Rahmen der Implantation des Telemetriesenders.

In der sich anschließenden Phase mit Nierenarterienclip und stimuliertem Renin-Angiotensin-System wurden die Versuchstiere randomisiert einer der beiden Behandlungsgruppen zugeteilt. 14 der 25 in diese Versuchsphase eingeschlossenen Wistar-Tiere wurden einer Behandlung mit Placebo, elf einer mit Hydralazin zugeführt. Alle mit Placebo behandelten Tiere überlebten die Clipphase. Unter der Behandlung mit Hydralazin verstarben drei Tiere.

Bei den Brown-Norway-Katholiek-Ratten verstarben fünf Tiere aus der Placebogruppe und neun aus der Behandlungsgruppe mit Hydralazin im Rahmen der Clipimplantation. Die Letalität dieser Operation betrug somit 31.8 % (14 von 44 Tieren). Zwei der mit Placebo und zehn der mit Hydralazin behandelten Tiere verstarben im Verlauf der Clipphase. Somit beendeten in diesem Tierstamm jeweils neun Versuchstiere beider Behandlungsgruppen diese Phase erfolgreich. Als Todesursachen waren neben Blutungen während der Clipimplantation vor allem fehlerhafte Intubationen mit nachfolgender Medikamentenapplikation in die Trachea im Rahmen der Gavage zu beobachten.

Insgesamt überlebten 58.0 % der Versuchstiere (40 von 69 Tieren) die zweite Phase des experimentellen Protokolls.

Alle Versuchstiere des Wistar-Tierstammes – sowohl aus der Placebo- als auch aus der Hydralazin-Behandlungsgruppe – überlebten die abschließende Protokollphase nach Entfernung des Clips von der Nierenarterie und sich wieder normalisierendem Renin-Angiotensin-System. Ein Brown-Norway-Katholiek-Versuchstier aus der Behandlungsgruppe mit Placebo verstarb unmittelbar nach Explantation des Nierenarterienclips. Mit allen Tieren aus der in der vorherigen Phase mit Hydralazin behandelten Gruppe konnte das Protokoll erfolgreich abgeschlossen werden. Insgesamt überlebten somit 97.5 % aller in die Kontrollphase 2 eingeschlossenen Versuchstiere die letzten drei Wochen des Experiments (39 von 40 Tieren).

Von 111 Tieren bei Versuchsbeginn überlebten somit 35.1 % (39 von 111 Tieren) das gesamte Protokoll. Ausschließlich diese Tiere wurden in die statistische Auswertung aufgenommen.

### **3.1.2 Powerspektralanalyse bei doppelt-transgenen Ratten**

Insgesamt wurden in diesem zweiten Versuch acht Wildtyp-Tiere und elf doppelt-transgene SD-Ratten untersucht. Sämtliche acht Blutdruckregistrierungen der Wildtyp-Tiere konnten in die statistische Auswertung aufgenommen werden. Bei zwei der elf doppelt-transgenen SD-Ratten war die Amplitude des Blutdrucksignals zu gering, so daß eine Auswertung der Blutdruckkurven nicht möglich war. Diese beiden Versuchstiere wurden aus der weiteren statistischen Auswertung ausgeschlossen.



## 3.2 Körpergewicht

Abbildung 3.1 zeigt den Gewichtsverlauf aller vier Versuchsgruppen während der drei experimentellen Phasen.

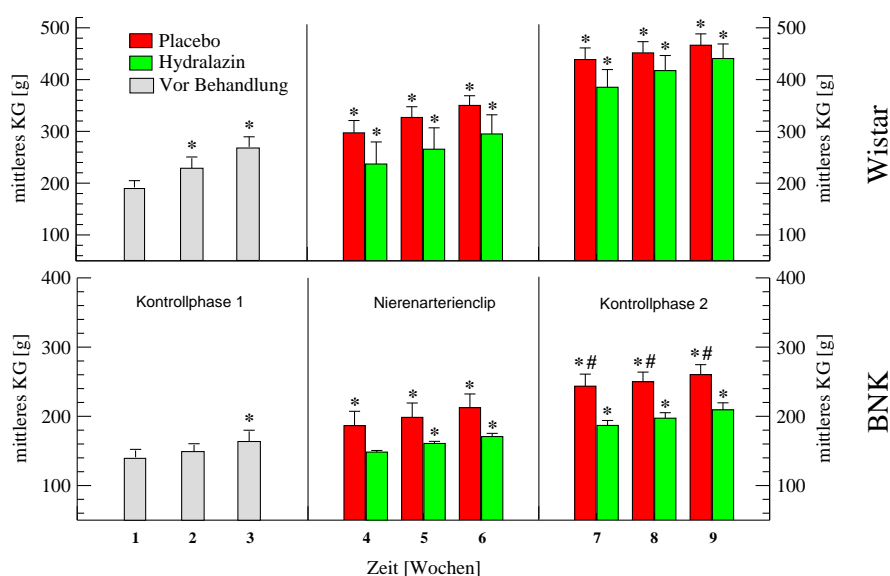


Abbildung 3.1: Entwicklung des Körpergewichts aller Versuchsgruppen. Der obere Abbildungsabschnitt zeigt beide Behandlungsgruppen des Wistar-Stammes. Vor Einteilung in eine der beiden Behandlungsgruppen sind die Tiere durch graue Balken gekennzeichnet. Rote Balken kennzeichnen eine Behandlung mit Placebo (n=14), grüne eine mit Hydralazin (n=8). In der unteren Graphik sind die entsprechenden Gruppen des Brown-Norway-Katholik-Stammes abgebildet. Placebobehandlung: rote Balken (n=8), Hydralazinbehandlung: grüne Balken (n=9). X-Achse: Zeit, Y-Achse: Körpergewicht. \*:  $p < 0,05$  im Vergleich zum Körpergewicht der ersten Behandlungswoche, #:  $p < 0,05$  im Vergleich zwischen beiden Behandlungsgruppen.

Nach Implantation des Telemetriesenders stieg das Körpergewicht innerhalb der ersten Kontrollphase bei beiden Tierstämmen nahezu linear an. Bei beiden Versuchsgruppen aus dem Wistar-Tierstamm war der wöchentliche Gewichtszuwachs im Vergleich zu beiden Versuchsgruppen aus dem Brown-Norway-Katholik-Tierstamm etwa doppelt so stark. Während sich das Körpergewicht bei den Wistar-Versuchstieren bereits ab der zweiten Versuchswoche signifikant erhöhte, fand sich dieser signifikante Zuwachs bei den BNK-Tieren erst ab der dritten Versuchswoche.

Während der ersten Protokollphase bestanden zwischen den beiden Behandlungsgruppen jedes Tierstammes keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Körpergewichtsentwicklung.

In der ersten postoperativen Woche nach der Implantation des Nierenarterienclips stagnierte das Gewicht beider Kontrollgruppen auf dem Niveau der vorangegangenen Woche (letzte Woche der ersten Kontrollphase). Im Gegensatz hierzu fiel das Körpergewicht beider mit Hydralazin behandelten Versuchsgruppen in der ersten postoperativen Woche ab und erreichte bei den BNK-Tieren sogar wieder das Ausgangsgewicht. In den beiden folgenden Wochen der Clipphase kam es in allen Gruppen erneut zu einem kontinuierlichen Gewichtszuwachs. Während die mittlere wöchentliche Gewichtszunahme bei beiden Versuchsgruppen des Wistar-Stammes etwa 30 g pro Woche betrug, lag sie bei den BNK-Tieren mit etwa 10 g deutlich darunter. Diese unterschiedliche Gewichtsentwicklung der beiden Tierstämme ist aus der Literatur bekannt [30]. Sowohl bei den Wistar- als auch bei den Brown-Norway-Katholik-Versuchsgruppen bestanden während dieser Phase keine signifikanten Unterschiede zwischen der Gewichtsentwicklung beider korrespondierender Behandlungsgruppen.

Nach der Explantation des Nierenarterienclips fand in beiden Behandlungsgruppen des Wistar-Tierstammes ein initial verstärkter Gewichtszuwachs statt, der sich in der zweiten und dritten Woche wieder an das Niveau der beiden vorangegangenen Phasen anglich. Bei den Versuchstieren des Brown-Norway-Katholik-Tierstammes blieb die wöchentliche Gewichtszunahme nahezu unverändert. In dieser Phase bestand zwischen beiden Behandlungsgruppen dieses Tierstammes ein statistisch signifikanter Unterschied in der Gewichtsentwicklung.

### 3.3 Trinkmenge

Die Entwicklung der täglichen Trinkmenge ist der Abbildung 3.2 zu entnehmen.

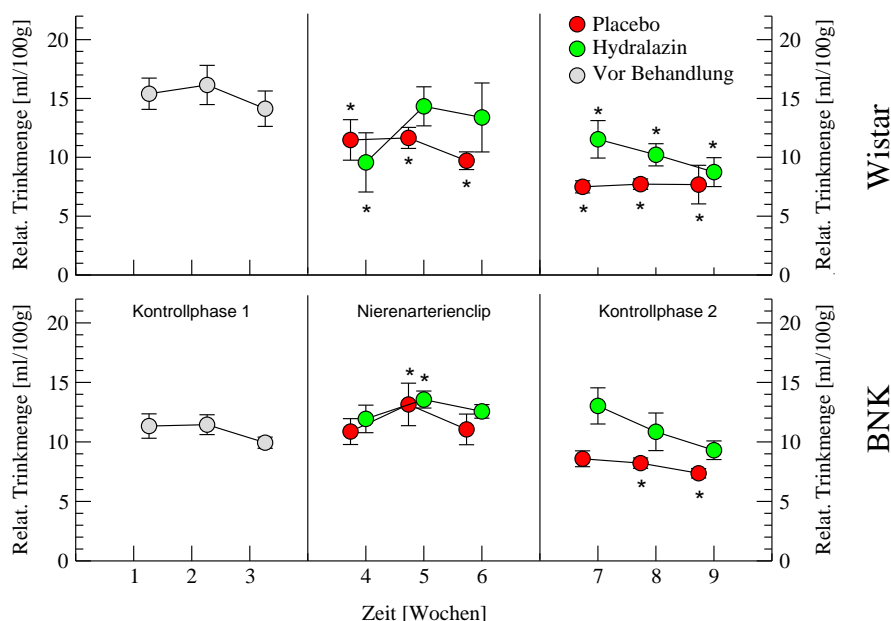


Abbildung 3.2: Relative tägliche Trinkmenge aller Versuchsgruppen während des gesamten Protokollzeitraums. Hierbei wurden die täglichen Trinkmengen in Bezug gesetzt zum aktuellen Körpergewicht (pro 100 g). Im oberen Teil der Abbildung sind beide Behandlungsgruppen aus dem Wistar-, im unteren Abschnitt die des BNK-Tierstammes dargestellt. Graue Kreise kennzeichnen alle Versuchstiere des jeweiligen Stammes vor Zuordnung in eine der beiden Behandlungsgruppen. Rote Kreise stehen für eine Behandlung mit Placebo, grüne für eine mit Hydralazin. X-Achse: Zeit, Y-Achse: Trinkmenge. \*:  $p < 0,05$  im Vergleich zur ersten Kontrollwoche.

Sowohl bei den Wistar- als auch bei den BNK-Ratten waren die relativen täglichen Trinkmengen innerhalb der ersten drei Versuchswochen konstant. Zwischen beiden Tierstämmen bestand während der ersten Kontrollphase ein statistisch signifikant unterschiedliches Trinkverhalten ( $p < 0,05$ ). Mit Clipimplantation nahm die relative Trinkmenge beider Versuchsgruppen des Wistar-Stammes signifikant ab. Während sich das Trinkverhalten der mit Hydralazin behandelten Tiere in der zweiten und dritten Woche dem Ausgangsniveau anglich, blieb es in der Placebogruppe signifikant erniedrigt. Beide BNK-Versuchsgruppen zeigten in der zweiten Woche dieser Phase ein gesteigertes Trinkverhalten. Ansonsten bestand in diesem Tierstamm unter stimuliertem RAS kein Unterschied zum Trinkverhalten unter Ausgangsbedingungen.

Nach der Explantation des Nierenarterienclips war in beiden Versuchsgruppen des Wistar-Stammes ein weiterer Abfall der relativen täglichen Trinkmenge zu beobachten. Das Trinkverhalten beider Versuchsgruppen aus dem BNK-Stamm hingegen unterschied sich in der ersten Woche nach Clipexplantation nicht von dem unter Ausgangsbedingungen. In der Hydralazingruppe blieb das Trinkverhalten über den gesamten Zeitraum unter erneuten Kontrollbedingungen im Vergleich zur ersten Kontrollphase unverändert. Im Gegensatz dazu ließ sich bei der Kontrollgruppe in den letzten beiden Wochen des Experimentes ein signifikant abgeschwächtes Trinkverhalten feststellen.

### 3.4 Tägliche Hydralazindosis

Abbildung 3.3 zeigt den Verlauf der täglich aufgenommenen Hydralazindosis.

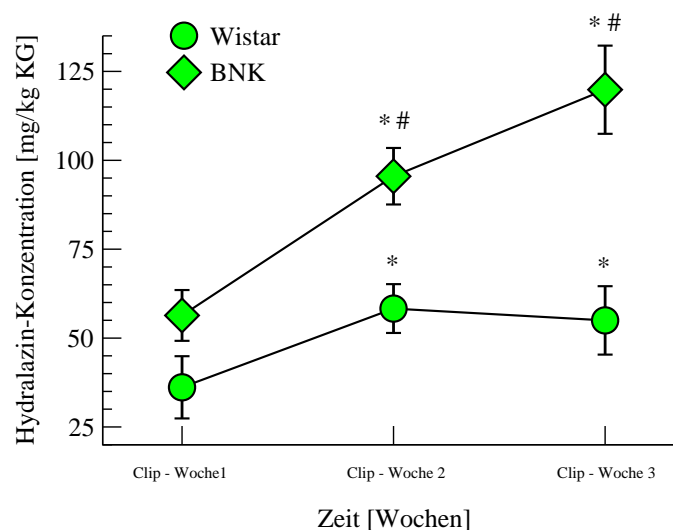


Abbildung 3.3: Mittlere täglich applizierte Hydralazin-Konzentration unter stimuliertem RAS bei den medikamentös mit Hydralazin behandelten Wistar- (grüne Kreise) und BNK-Versuchstieren (grüne Rechtecke). X-Achse: Zeit, Y-Achse: Hydralazin-Konzentration. \*:  $p < 0,05$  im Vergleich zur applizierten Hydralazin-Konzentration in der ersten Woche der Clippphase, #:  $p < 0,05$  im Vergleich zum anderen Tierstamm.

Die in der Literatur für eine Blutdrucknormalisierung angegebene Hydralazin-Konzentration von 40 mg pro Kilogramm Körpergewicht [46] reichte lediglich im Wistar-Tierstamm innerhalb der ersten Woche der Clippphase aus, den Blutdruck auf das Ausgangsniveau zu senken.

Die im Verlauf dieser Phase zur Blutdrucksenkung benötigten Hydralazindosen stiegen sowohl bei den Wistar- als auch bei den BNK-Tieren signifikant an. Die mittlere täglich zur Drucksenkung applizierte Hydralazindosis belief sich bei den Wistar-Tieren auf circa 60 mg Hydralazin in der zweiten und dritten Woche. Bei den BNK-Tieren bestand ein nahezu linearer Zuwachs der erforderlichen Hydralazindosis. In der zweiten Woche waren 90 mg Hydralazin/kg und in der dritten Woche sogar 120 mg/kg Körpergewicht notwendig, um den Blutdruck annähernd auf das Ausgangsniveau zu senken.

Die mittlere, wöchentlich zur Blutdrucksenkung erforderliche Hydralazindosis unterschied sich in der zweiten und dritten Woche der Clipphase signifikant zwischen beiden Tierstämmen.

### 3.5 Reninaktivität

Abbildung 3.4 zeigt die Reninaktivitäten während der drei Versuchsphasen.

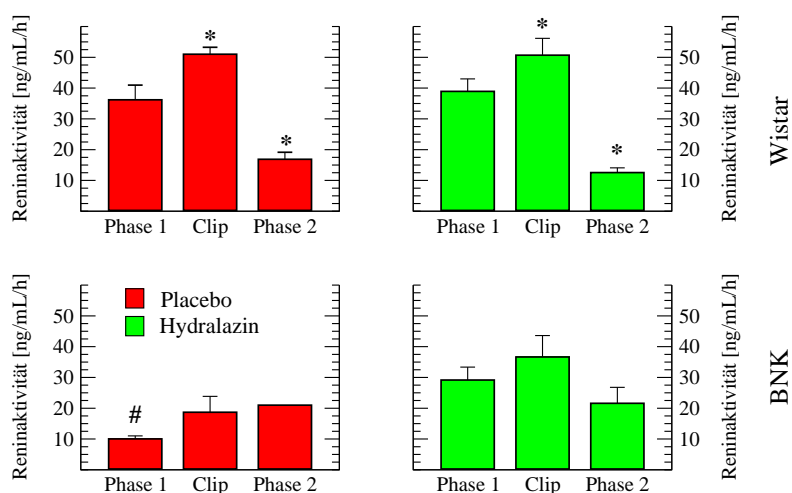


Abbildung 3.4: Reninaktivitäten während der drei Protokollphasen bei den mit Placebo (rote Säulen) und Hydralazin (grüne Säulen) behandelten Wistar- (obere Hälfte) und Brown-Norway-Katholiek-Ratten (untere Hälfte). X-Achse: Experimentelle Phase, Y-Achse: Reninaktivität. \*:  $p < 0,05$  im Vergleich zu den Reninaktivitäten während der ersten Kontrollphase. #:  $p < 0,05$  im Vergleich zwischen beiden Behandlungsgruppen.

Hämolytische Proben wurden von der Reninaktivitätsmessung ausgeschlossen. Von beiden Behandlungsgruppen des Wistar-Tierstammes konnten in jeder Phase hierdurch durchschnittlich nur vier Reninaktivitäten bestimmt werden. Die

Kontrollgruppe des BNK-Tierstammes wies in der zweiten Kontrollphase aufgrund von Hämolyse und fehlenden Proben nur einen vorliegenden Meßwert auf, so daß hier auf eine statistische Auswertung der Reninaktivitäten verzichtet wurde.

Beide Behandlungsgruppen des Wistar-Tierstammes wiesen eine signifikante Zunahme der Reninaktivität unter stimuliertem Renin-Angiotensin-System auf. In dieser Phase lag nahezu eine Verdoppelung der Reninaktivität vor. Diese Aktivitätszunahme fehlte bei beiden Versuchsgruppen des BNK-Tierstammes.

Nach der Explantation des Nierenarterienclips fiel die Reninaktivität in beiden Behandlungsgruppen des Wistar-Stammes im Vergleich zur ersten Kontrollphase signifikant ab.

Die mit Placebo behandelten Wistar-Tiere wiesen eine Halbierung der Reninaktivität im Vergleich zur ersten Kontrollphase auf, die Behandlungsgruppe mit Hydralazin sogar eine Reduktion um den Faktor drei. Bei den Brown-Norway-Katholiek-Tieren war eine statistische Auswertung lediglich in der Behandlungsgruppe mit Hydralazin möglich. Auch hier fiel die Reninaktivität um circa 25 % unter das Ausgangsniveau ab. Statistisch gesehen war diese Abnahme bei den relativ kleinen Fallzahlen jedoch nicht signifikant.

## 3.6 Originalregistrierungen

### 3.6.1 Wistar-Ratten

Die Abbildungen 3.5 und 3.7 zeigen Originalregistrierungen von Blutdruck und Herzfrequenz beider Behandlungsgruppen aus dem Wistar-Tierstamm, die Abbildung 3.6 gibt eine exemplarische 24-Stunden-Registrierung wieder.

#### Placebobehandlung

Abbildung 3.5 zeigt aus jedem der drei Protokollabschnitte repräsentative Originalregistrierungen einer Wistar-Ratte, die während der Clippphase mit Placebo behandelt wurde.

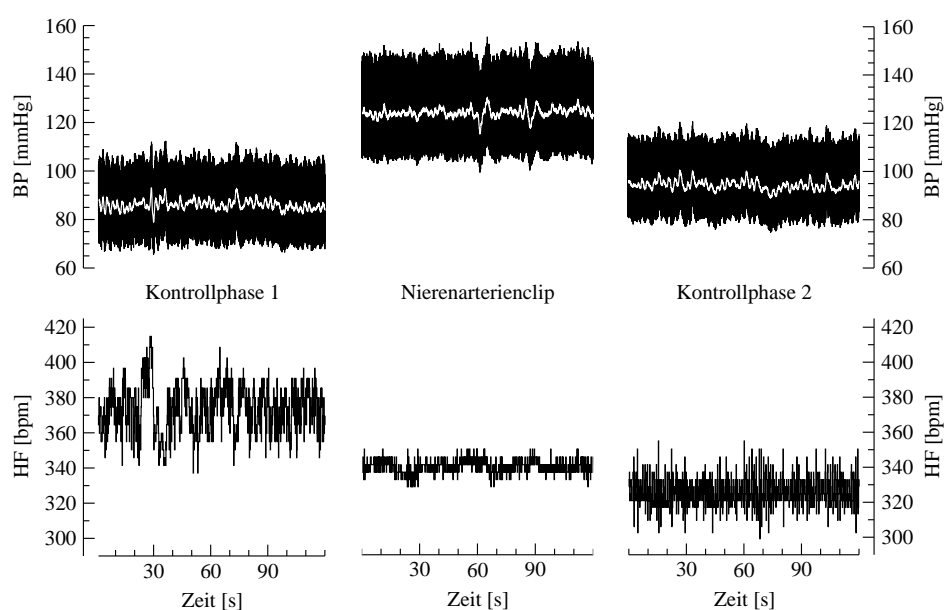


Abbildung 3.5: Originale Blutdruckaufzeichnungen mit korrespondierenden Herzfrequenzen einer während der Clippphase mit Placebo behandelten Wistar-Ratte zu allen drei Zeitpunkten des Protokolls, X-Achse: Zeit, Y-Achse: Blutdruck (oben) bzw. Herzfrequenz (unten).

Bei den mit Placebo behandelten Wistar-Ratten stieg der Blutdruck unter Bedingungen mit stimuliertem Renin-Angiotensin-System signifikant an (Nierenarterienclip). Nach der Explantation des Clips fiel der Blutdruck in der zweiten Kontrollphase wieder auf das Ausgangsniveau (Kontrollphase 1) ab. Die Herzfrequenz nahm im Laufe des Experimentes sukzessive ab.

Abbildung 3.6 gibt eine exemplarische 24-Stunden-Registrierung eines Kontrolltieres unter Ausgangsbedingungen repräsentativ für beide Versuchsgruppen des Wistar-Tierstammes wieder.

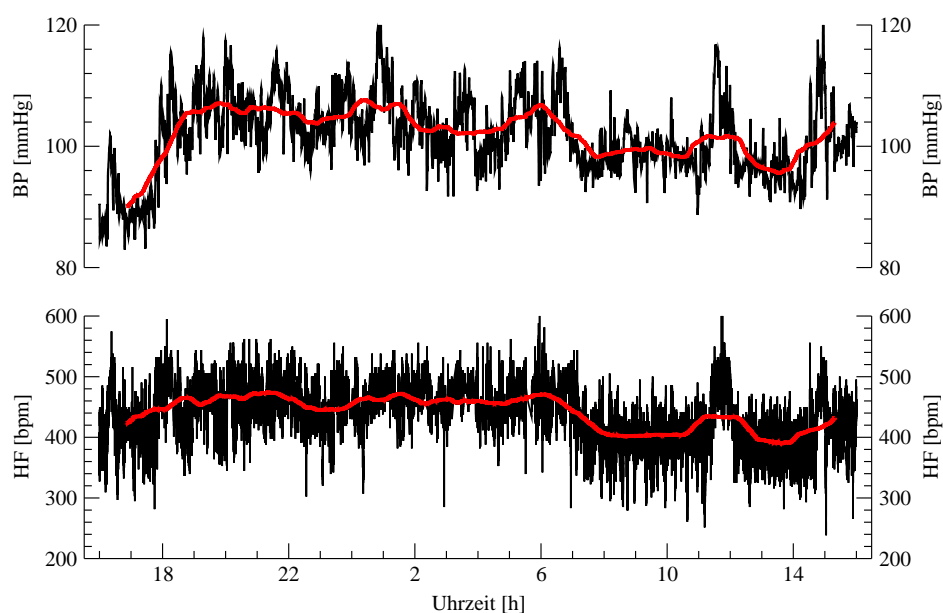


Abbildung 3.6: Originale 24-Stunden-Blutdruckregistrierung einer Wistar-Ratte, die in der Clipphase mit Placebo behandelt wurde, unter initialen Kontrollbedingungen. X-Achse: Zeit, Y-Achse: Blutdruck (oben) bzw. Herzfrequenz (unten).

In der 24-Stunden-Messung konnte eine zirkadiane Rhythmik mit Blutdruck- und Herzfrequenzabfall am Tage (06-18 Uhr) gefunden werden. Während aller drei Versuchsabschnitte zeigten alle Tiere beider Behandlungsgruppen diese zirkadiane Rhythmik. Statistisch unterschieden sich beide Gruppen nicht voneinander ( $p > 0,05$ , two-way-ANOVA - Daten nicht gezeigt).



## Hydralazinbehandlung

Exemplarische Originalregistrierungen einer während der Clipphase mit Hydralazin behandelten Wistar-Ratte sind in der folgenden Abbildung 3.7 dargestellt.

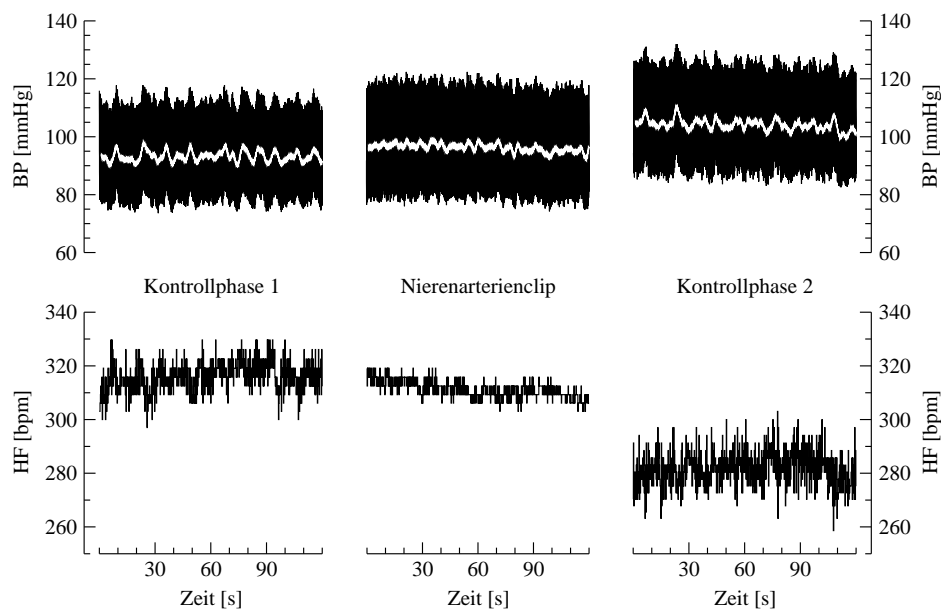


Abbildung 3.7: Originale Blutdruckaufzeichnungen mit korrespondierenden Herzfrequenzen einer während der Clipphase mit Hydralazin behandelten Wistar-Ratte zu allen drei Phasen des Protokolls. X-Achse: Zeit, Y-Achse: Blutdruck (oben) bzw. Herzfrequenz (unten).

In dieser Versuchsgruppe konnte ein Blutdruckanstieg unter stimuliertem Renin-Angiotensin-System (Nierenarterienclip) durch eine Behandlung mit Hydralazin verhindert werden. In der ersten Woche nach der Clipexplantation (Kontrollphase 2) waren die Blutdruckwerte initial erhöht, fielen im weiteren Verlauf jedoch wieder auf das Ausgangsniveau ab.

Auch in dieser Versuchsgruppe war ein sukzessiver Abfall der Herzfrequenz über den gesamten Protokollverlauf zu verzeichnen.

### 3.6.2 Brown-Norway-Katholiek-Ratten

Abbildung 3.8 und 3.10 zeigen Blutdruck- und Herzfrequenzregistrierungen aus beiden Behandlungsgruppen des Brown-Norway-Katholiek-Tierstammes. Abbildung 3.9 zeigt eine exemplarische 24-Stunden-Registrierung eines mit Placebo behandelten Kontrolltieres während der ersten Kontrollphase.

#### Placebobehandlung

In Abbildung 3.8 finden sich Einzelregistrierungen eines Brown-Norway-Katholiek-Kontrolltieres.

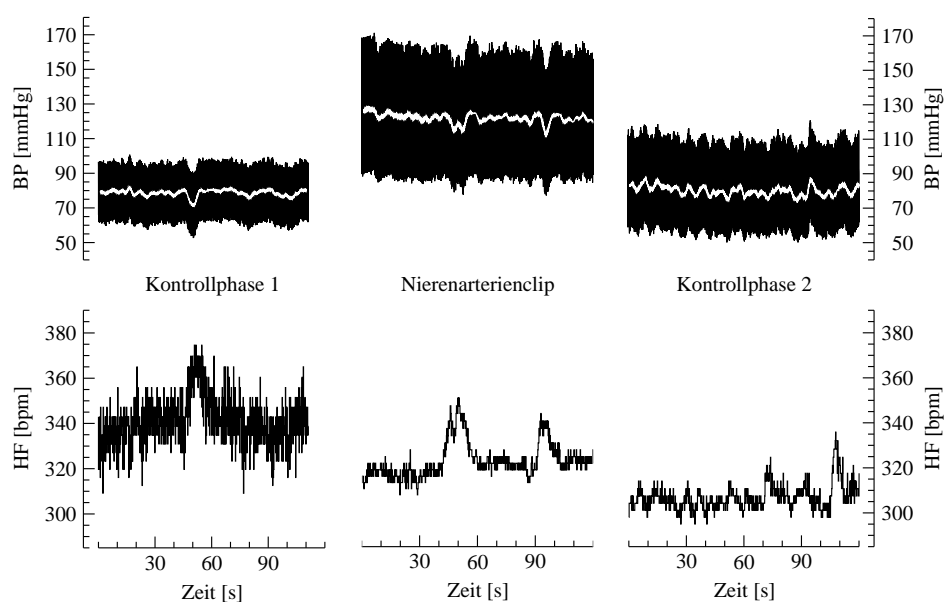


Abbildung 3.8: Originale Blutdruckregistrierungen mit korrespondierenden Herzfrequenzen eines Kontrolltieres (Placebobehandlung) aus dem Brown-Norway-Katholiek-Tierstamm zu allen drei Phasen des Protokolls. X-Achse: Zeit, Y-Achse: Blutdruck (oben) bzw. Herzfrequenz (unten).

Bei den Kontrolltieren der kinindefizienten Brown-Norway-Ratten kam es unter stimuliertem Renin-Angiotensin-System (Nierenarterienclip) zu einem signifikanten Blutdruckanstieg. Nach Explantation des Clips (Kontrollphase 2) normalisierte sich der Blutdruck in dieser Gruppe wieder.

Abbildung 3.9 gibt eine 24-Stunden-Registrierung eines Kontrolltieres des Brown-Norway-Katholiek-Tierstammes exemplarisch für beide Versuchsgruppen wieder.

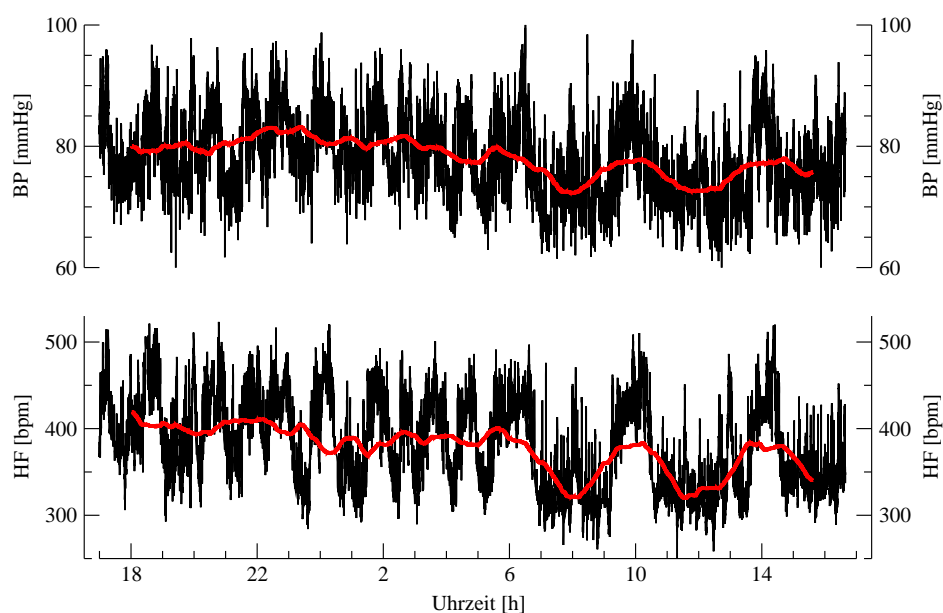


Abbildung 3.9: Originale 24-Stunden-Blutdruckregistrierung eines Kontrolltieres aus dem Brown-Norway-Katholiek-Tierstamm unter initialen Kontrollbedingungen. X-Achse: Zeit, Y-Achse: Blutdruck (oben) bzw. Herzfrequenz (unten).

Auch bei allen Versuchstieren des Brown-Norway-Katholiek-Stammes lag über den gesamten Protokollzeitraum eine zirkadiane Rhythmik mit Blutdruck- und Herzfrequenzabfällen am Tage vor.

Wie bei beiden Behandlungsgruppen aus dem Wistar-Stamm bestanden zwischen beiden Behandlungsgruppen des BNK-Tierstammes keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der zirkadianen Rhythmik.

## Hydralazinbehandlung

Im folgenden werden exemplarische Originalregistrierungen aus der Hydralazin-gruppe des Brown-Norway-Katholiek-Tierstammes wiedergegeben.

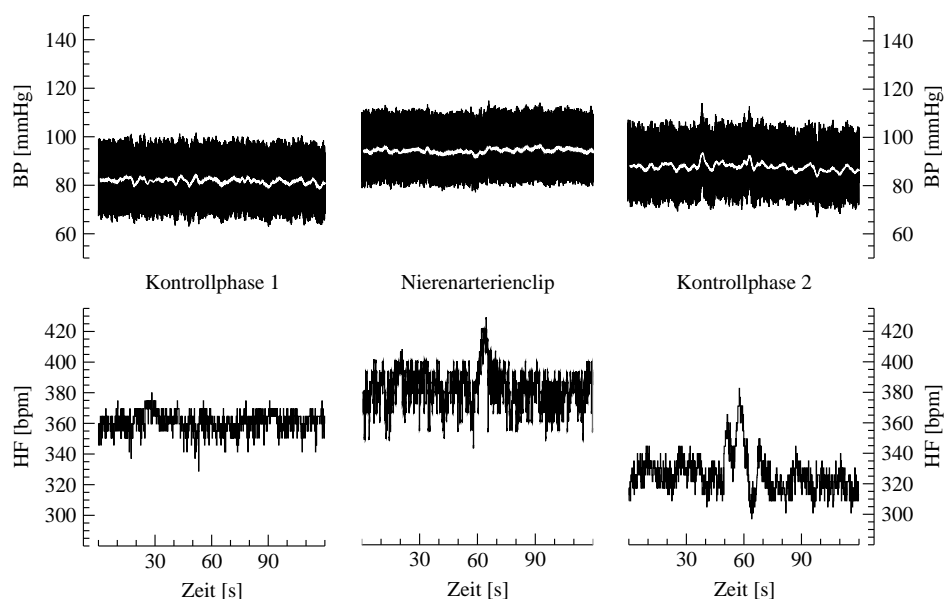


Abbildung 3.10: Originale Blutdruckaufzeichnungen mit korrespondierenden Herzfrequenzen einer während der Clippphase mit Hydralazin behandelten Brown-Norway-Katholiek-Ratte. X-Achse: Zeit, Y-Achse: Blutdruck (oben) bzw. Herzfrequenz (unten).

Bei den kinindefizienten Brown-Norway-Tieren mit Hydralazinbehandlung fiel der Blutdruckanstieg unter stimuliertem RAS (Nierenarterienclip) im Vergleich zur Kontrollgruppe abgeschwächt aus. In der ersten Woche nach der Clipexplantation (Kontrollphase 2) blieben die Blutdruckwerte in dieser Gruppe im Vergleich zu den Ausgangsbedingungen auf einem signifikant erhöhten Niveau und fielen in den anschließenden zwei Wochen dieser Phase wieder auf das Ausgangsniveau ab.

### 3.6.3 Doppelt-transgene Sprague-Dawley-Ratten

In der Abbildung 3.11 ist exemplarisch eine Blutdruck- und Herzfrequenz-aufzeichnung eines doppelt-transgenen Versuchstieres (hAOGN, hREN) dargestellt.

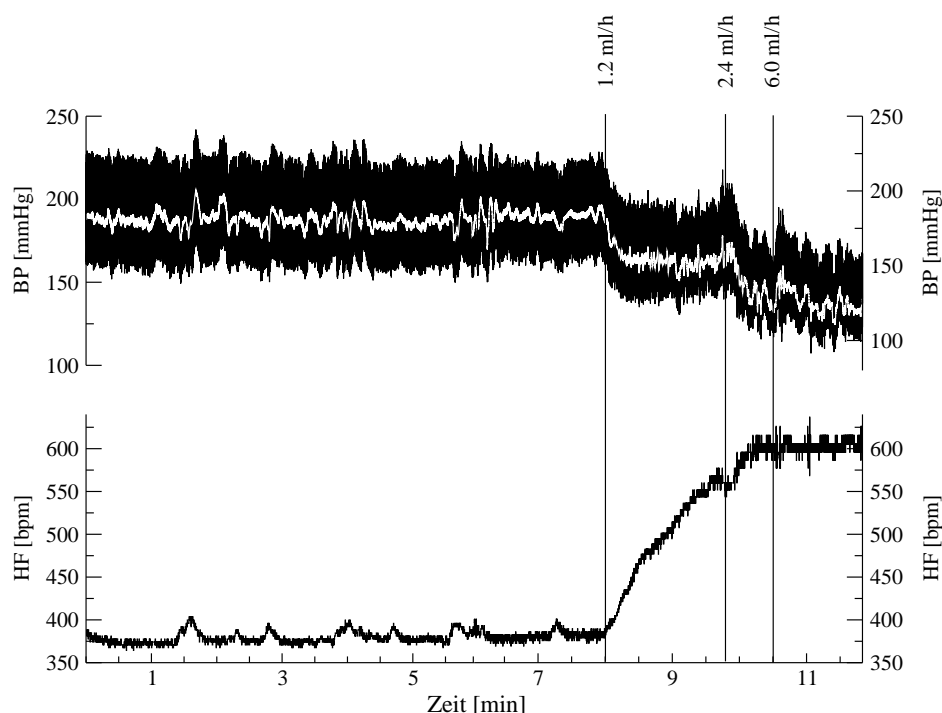


Abbildung 3.11: Originale Blutdruck- (oben) und Herzfrequenz-Registrierung (unten) einer doppelt-transgenen SD-Ratte unter Ruhebedingungen (erste 8 Minuten) und unter Infusion mit steigenden Dosen an NaNP ( $100\mu\text{g NaNP pro ml}$  à  $1.2\text{ ml/h}$ ,  $2.4\text{ ml/h}$  und  $6.0\text{ ml/h}$ ). X-Achse: Zeit, Y-Achse: Blutdruck (oben) bzw. Herzfrequenz (unten).

Unter basalen Ausgangsbedingungen wurden bei den transgenen Tieren hypertensive Blutdruckwerte in Ruhe gemessen. Unter der Infusion mit steigenden Konzentrationen an Natrium-Nitroprussid ließ sich ein kontinuierlicher Blutdruckabfall auf einen Mitteldruck von zuletzt  $137 \pm 10.9\text{ mmHg}$  verzeichnen. Im Gegensatz hierzu stieg die Herzfrequenz kontinuierlich an.

## 3.7 Blutdruck und Herzfrequenz

Die Abbildungen 3.12 und 3.13 zeigen den Verlauf von Blutdruck und Herzfrequenz aller Versuchsgruppen während des gesamten Versuchszeitraumes.

### 3.7.1 Wistar-Ratten

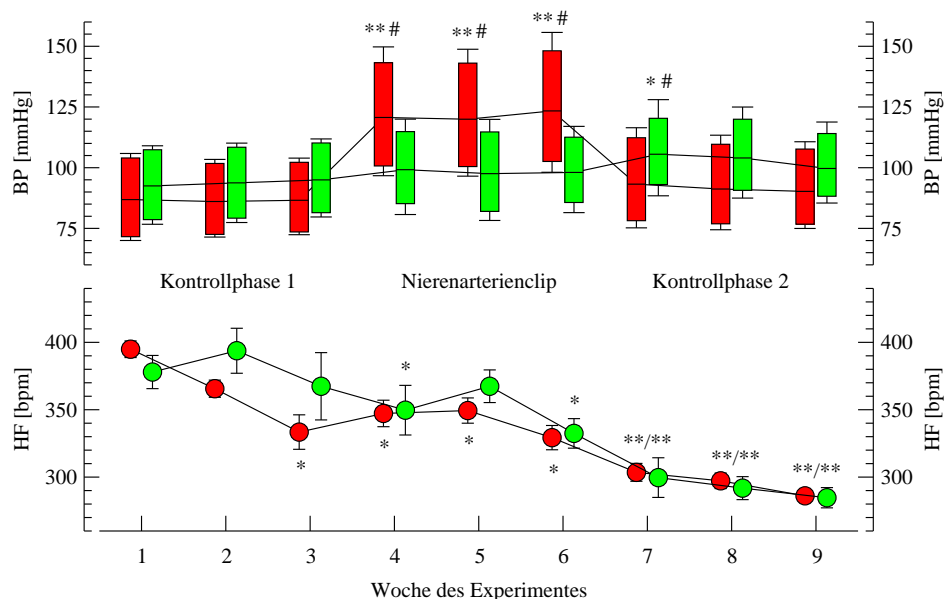


Abbildung 3.12: Zeitverlauf von Blutdruck und Herzfrequenz beider Behandlungsgruppen aus dem Wistar-Stamm. Die obere Graphik zeigt den Zeitverlauf von systolischem und diastolischem Blutdruck (oberer respektive unterer Balken der Box), sowie des Mitteldrucks (durchgezogene Linie). Die untere Graphik stellt die dazugehörigen mittleren Herzfrequenzen dar. Die mit Placebo behandelten Tiere (n=14) sind in rot, die mit Hydralazin behandelten Tiere (n=8) in grün dargestellt. X-Achse: Zeit, Y-Achse: Blutdruck (obere Graphik) bzw. Herzfrequenz (untere Graphik). \*:  $p < 0,05$  und \*\*:  $p < 0,01$  im Vergleich zur ersten Kontrollwoche, #:  $p < 0,05$  im Vergleich zwischen beiden Behandlungsgruppen.

Bei den Wistar-Ratten lagen während der ersten Kontrollphase keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Parametern des Blutdrucks vor. Lediglich in der letzten Woche der ersten Kontrollphase war die Herzfrequenz bei den mit Placebo behandelten Tieren im Vergleich zur ersten Kontrollwoche signifikant erniedrigt. In allen darauffolgenden Wochen blieb sie in dieser Behandlungsgruppe signifikant unter den Ausgangswerten der ersten Kontrollwoche.

Auffällig waren im Vergleich zu den Referenzwerten der ersten Kontrollwoche die in allen drei Wochen mit Nierenarterienclip signifikant erhöhten Blutdruckwerte in der mit Placebo behandelten Gruppe. Bei den mit Hydralazin behandelten Versuchstieren stieg der Blutdruck während dieser Phase nicht an. In der ersten und dritten Woche der Clipphase lag auch die Herzfrequenz der mit Hydralazin behandelten Tiere signifikant unter dem Frequenzniveau der initialen Ausgangsbedingungen. Statistisch gesehen waren sowohl die Verläufe des systolischen und diastolischen Blutdrucks als auch des Mitteldrucks während des gesamten Zeitraumes mit stimuliertem Renin-Angiotensin-System zwischen beiden Behandlungsgruppen signifikant verschieden.

Nach der Explantation des Nierenarterienclips normalisierten sich die drei Blutdruckparameter bei den zuvor mit Placebo behandelten Tieren. Im Vergleich zur ersten Kontrollwoche war der Blutdruck zu keinem Zeitpunkt auf einem erhöhten Niveau. Bei den in der vorangegangenen Phase mit Hydralazin behandelten Versuchstieren fanden sich statistisch in der ersten Woche nach Clipexplantation signifikant erhöhte Druckwerte, die im weiteren Verlauf unter erneuten Kontrollbedingungen wieder auf das Ausgangsniveau abfielen. In der ersten Woche dieser Phase unterschieden sich die Druckwerte beider Behandlungsgruppen signifikant voneinander.

### 3.7.2 Brown-Norway-Katholiek-Ratten

Der entsprechende Verlauf von Blutdruck und Herzfrequenz beider Behandlungsgruppen des BNK-Stammes ist der Abbildung 3.13 zu entnehmen.

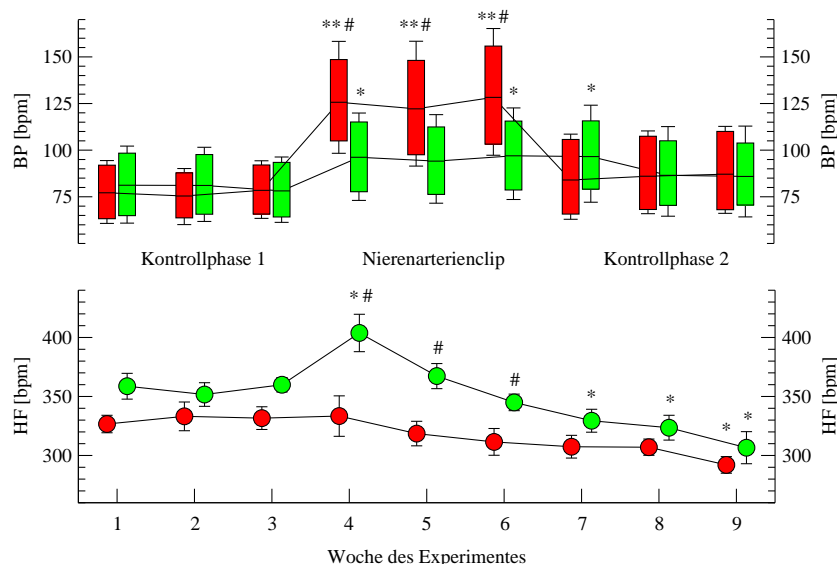


Abbildung 3.13: Zeitverlauf von Blutdruck und Herzfrequenz beider Behandlungsgruppen aus dem Brown-Norway-Katholiek-Stamm. Die obere Graphik zeigt den Zeitverlauf von systolischem und diastolischem Blutdruck (oberer respektive unterer Balken der Box), sowie des Mitteldrucks (durchgezogene Linie). Die untere Graphik stellt die dazugehörigen mittleren Herzfrequenzen dar. Die mit Placebo behandelten Tiere (n=8) sind in roter, die mit Hydralazin (n=9) in grüner Farbe dargestellt. X-Achse: Zeit, Y-Achse: Blutdruck (obere Graphik) bzw. Herzfrequenz (untere Graphik). \*:  $p < 0,05$  und \*\*:  $p < 0,01$  im Vergleich zur ersten Kontrollwoche, #:  $p < 0,05$  im Vergleich zwischen beiden Behandlungsgruppen.

Im Gegensatz zu beiden Versuchsgruppen aus dem Wistar-Tierstamm wiesen die korrespondierenden Brown-Norway-Katholiek-Versuchsgruppen unter Ausgangsbedingungen (Kontrollphase 1) ein niedrigeres Druckniveau auf. Unter stimuliertem RAS waren die Blutdruckwerte in der Placebogruppe über den gesamten Zeitraum und in der Hydralazingruppe in der ersten und letzten Woche dieser Phase signifikant erhöht. Dennoch unterschieden sich die Druckwerte beider Gruppen während der Clipphase signifikant voneinander. Die Herzfrequenz stieg bei den mit Hydralazin behandelten Tieren in der ersten Woche dieser Phase signifikant an während sie bei den mit Placebo behandelten Tieren unverändert blieb. Über den gesamten Zeitraum mit stimuliertem RAS bestanden signifikante Unterschiede zwischen den Herzfrequenzen beider Gruppen.



Nach der Explantation des Nierenarterienclips fielen systolischer, diastolischer sowie mittlerer Druck in der Placebogruppe wieder auf das Ausgangsniveau ab. Die Druckwerte in der Hydralazingruppe persistierten während der ersten Woche der zweiten Kontrollphase auf signifikant erhöhtem Niveau. Ab der zweiten Woche kam es auch hier zu einem Abfall der Druckwerte auf das Ausgangsniveau. Während die Herzfrequenz in der Hydralazingruppe in allen drei Wochen signifikant unter dem Referenzniveau lag, fiel sie in der Placebogruppe statistisch erst in der letzten Woche dieser Phase unter das Ausgangsniveau ab. Zwischen beiden Behandlungsgruppen bestanden während der letzten Kontrollphase keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich Blutdruck und Herzfrequenz.

### 3.7.3 Relative Blutdruckänderungen

Die Blutdruckänderungen vom Ausgangswert sind in Abbildung 3.14 dargestellt.

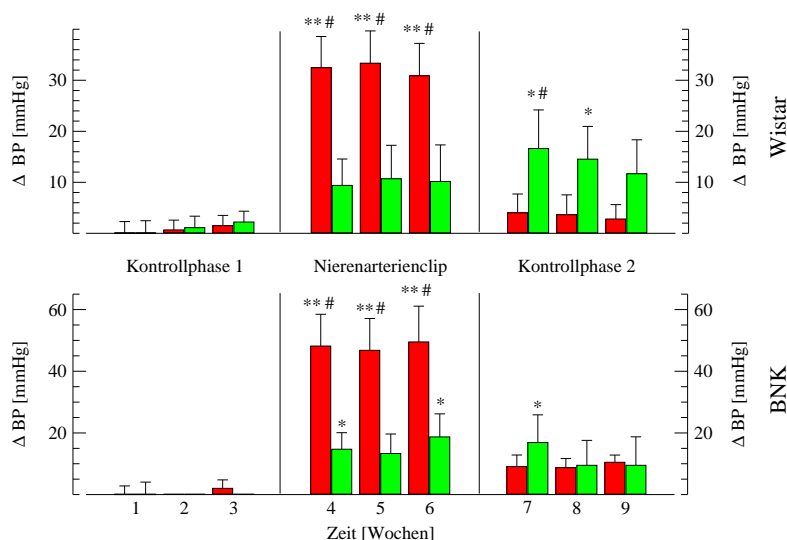


Abbildung 3.14: Blutdruckänderungen im Vergleich zur ersten Kontrollwoche. Die obere Graphik zeigt beide Wistar-Versuchsgruppen, die untere die entsprechenden BNK-Tiere. Mit Placebo behandelte Tiere sind in rot und mit Hydralazin behandelte Tiere in grün dargestellt. X-Achse: Zeit, Y-Achse: Änderungen des Blutdrucks, \*:  $p < 0,05$  und \*\*:  $p < 0,01$  im Vergleich zur ersten Kontrollwoche, #:  $p < 0,05$  im Vergleich zwischen beiden Behandlungsgruppen.

Während der ersten Kontrollphase unterschieden sich die Blutdruckwerte in allen Behandlungsgruppen nicht voneinander. Mit Clipimplantation und Stimulation des RAS stieg der Blutdruck in allen Versuchsgruppen an. Bei beiden mit Placebo behandelten Gruppen lagen die Blutdruckwerte über den gesamten Zeitraum mit stimuliertem RAS auf signifikant erhöhtem Niveau. Bei den mit Hydralazin

behandelten Wistar-Tieren war der Blutdruckanstieg unter stimuliertem RAS im Vergleich zur ersten Kontrollphase nicht signifikant. In der korrespondierenden Behandlungsgruppe aus dem BNK-Tierstamm stieg der Blutdruck hingegen in der ersten und letzten Woche der Clipphase auf ein signifikant erhöhtes Niveau an. Über den gesamten Zeitraum mit stimuliertem RAS bestanden signifikante Unterschiede zwischen beiden Behandlungsgruppen beider Tierstämme.

Während der Blutdruck nach der Clipexplantation in beiden Versuchsgruppen, die in der vorangegangenen Phase mit Placebo behandelt worden waren, statistisch wieder auf das Ausgangsniveau abfiel, blieb er bei beiden zuvor mit Hydralazin behandelten Versuchsgruppen in der ersten Woche auf statistisch signifikant erhöhtem Niveau. Ab der zweiten Woche fiel der BP wieder auf das Ausgangsniveau ab. Zwischen den Blutdruckwerten beider Behandlungsgruppen des Wistar-Tierstammes bestanden in der ersten Woche der letzten Kontrollphase signifikante Unterschiede. In der zweiten und dritten Woche dieser Phase waren die Unterschiede statistisch nicht mehr signifikant.

### 3.7.4 Doppelt-transgene Sprague-Dawley-Ratten

In der Abbildung 3.15 finden sich die gemittelten Blutdruck- und Herzfrequenzwerte von Wildtyp-Kontrolltieren (WT) sowie von transgenen Ratten basal (TG basal) und unter Infusion mit NaNP (TG NaNP).

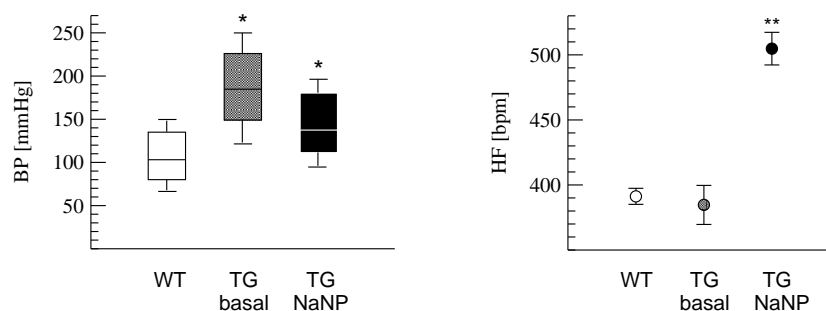


Abbildung 3.15: Blutdruck- und Herzfrequenzdiagramm der transgenen SD-Ratten (TG) und der Wildtyp-Kontrolltiere (WT). Der linken Graphik sind die Werte von systolischem, diastolischem und mittlerem Blutdruck zu entnehmen, der rechten die der Herzfrequenz. WT-Tiere sind in weißer, transgene Tiere basal in grauer (TG basal) und unter Infusion mit NaNP in schwarzer Farbe (TG NaNP) dargestellt. X-Achse: Versuchsgruppe, Y-Achse: Blutdruck (links) bzw. Herzfrequenz (rechts), \*:  $p < 0,05$  und \*\*:  $p < 0,01$  im Vergleich zu WT.

Unter Ruhebedingungen fanden sich zwischen den doppelt-transgenen SD-Ratten und den WT-Tieren signifikante Unterschiede in systolischem, diastolischem und mittlerem Blutdruck.

Während bei den WT-Tieren ein basaler Mitteldruck von  $103 \pm 1.1$  mmHg gemessen wurde, zeigten die doppelt-transgenen SD-Ratten Mitteldruckwerte von  $189 \pm 9.9$  mmHg in Ruhe.

Unter der Infusion mit NaNP kam es bei den transgenen Versuchstieren zu einem signifikanten Blutdruckabfall auf Mitteldruckwerte von  $137 \pm 10.9$  mmHg. Das Referenzniveau der WT von  $103 \pm 1.1$  mmHg konnte nicht erreicht werden.

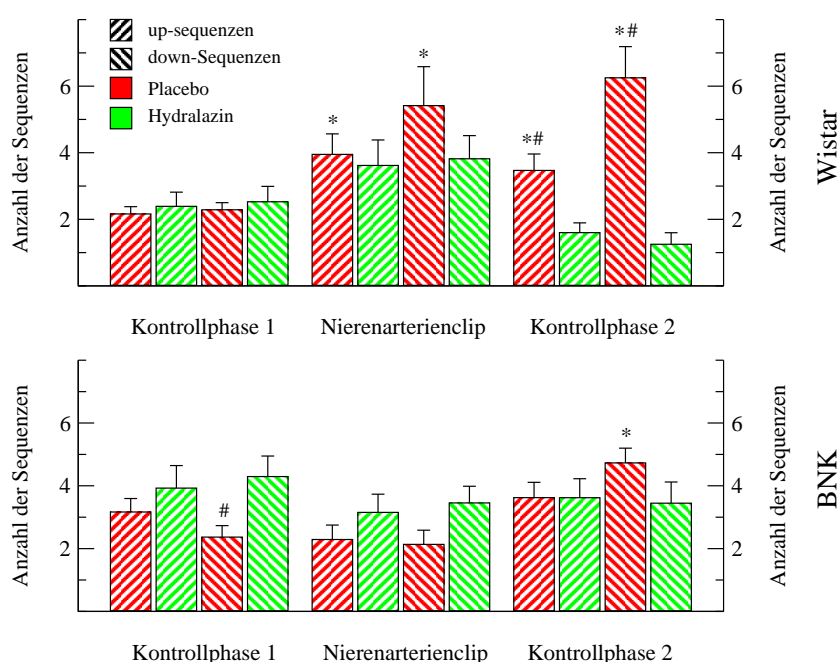
Die Herzfrequenz wies zwischen transgenen Ratten und Wildtyp-Tieren unter Ruhebedingungen keine signifikanten Unterschiede auf. Während bei den Wildtyp-Ratten eine Frequenz von  $391 \pm 6.2$  Schlägen pro Minute unter Ruhebedingungen gemessen wurde, lag die Ruhfrequenz der genetisch veränderten Tieren bei  $381 \pm 12.6$  Schlägen pro Minute.

Unter abfallendem Blutdruck unter der Infusion mit NaNP kam es bei den doppelt-transgenen Versuchstieren zu einer über den Baroreflex vermittelten Tachykardie mit Frequenzen von  $505 \pm 12.5$  Schlägen pro Minute. Die Herzfrequenz unterschied sich dabei signifikant von der der Wildtyp-Kontrolltiere und transgenen SD-Ratten unter Ausgangsbedingungen.

## 3.8 Barorezeptor-Reflex

### 3.8.1 Spontan auftretende Reflexaktivität

Zur Beurteilung des Barorezeptor-Reflexes gibt Abbildung 3.16 die Summe aller spontan auftretenden Sequenzen von mindestens drei aufeinanderfolgenden Herzaktionen wieder, in denen der Blutdruck anstieg und das Pulsintervall zunahm („up“-Sequenzen) oder der Blutdruck abfiel und sich das Pulsintervall verkürzte („down“-Sequenzen).



**Abbildung 3.16:** Die Abbildung zeigt spontan auftretende Episoden, in denen der Blutdruck anstieg und das Pulsintervall zunahm („up“-Sequenzen, ansteigende Schraffierung) oder der Blutdruck abfiel und das Pulsintervall kleiner wurde („down“-Sequenzen, abfallende Schraffierung). Die obere Graphik zeigt beide Behandlungsgruppen aus dem Wistar-, die untere Graphik die aus dem BNK-Tierstamm. Mit Placebo behandelte Tiere sind in roter und mit Hydralazin behandelte Tiere in grüner Farbe dargestellt. X-Achse: Protokollphase, Y-Achse: Anzahl der Sequenzen. \*:  $p < 0,05$  im Vergleich zur ersten Kontrollphase, #:  $p < 0,05$  im Vergleich zwischen beiden Behandlungsgruppen.

Unter anfänglichen Kontrollbedingungen gab es bei beiden Behandlungsgruppen des Wistar-Tierstammes durchschnittlich je zwei „up“- und „down“-Sequenzen. Zwischen beiden Gruppen bestanden keine Unterschiede. Mit stimuliertem RAS kam es unter der Placebobehandlung zu einer signifikanten Zunahme an „up“- und „down“-Sequenzen. Auch in der Behandlungsgruppe

mit Hydralazin kam es zu einer Zunahme von „up“- und „down“-Sequenzen, die jedoch statistisch nicht signifikant war. In der Placebogruppe blieb sowohl die Anzahl der „up“- als auch der „down“-Sequenzen unter erneuten Kontrollbedingungen (Kontrollphase 2) auf signifikant erhöhtem Niveau. Im Gegensatz hierzu war die Barorezeptor-Reflexaktivität in der zweiten Kontrollphase bei der Behandlungsgruppe mit Hydralazin im Vergleich zu den Ausgangsbedingungen (Kontrollphase 1) unverändert. Bezüglich der „up“- und „down“-Sequenzen bestanden in dieser Phase signifikante Unterschiede zwischen beiden Behandlungsgruppen.

Das Verteilungsmuster der „up“- und „down“-Sequenzen war bei den kinindefizienten Brown-Norway-Versuchstieren unter initialen Kontrollbedingungen unterschiedlich. Statistisch gesehen wiesen die Tiere der Hydralazingruppe in dieser Phase mehr „down“-Sequenzen auf als die der Kontrollgruppe.

Mit der Clipimplantation und Stimulation des Renin-Angiotensin-Systems änderte sich das Verteilungsmuster bei gleichbleibender Anzahl an „up“- und „down“-Sequenzen nicht, die Anzahl an „down“-Sequenzen unterschied sich jedoch statistisch gesehen nicht mehr zwischen beiden Behandlungsgruppen.

Mit der Clipexplantation kam es in der Kontrollgruppe zu einer Zunahme an „down“-Sequenzen. In der Hydralazingruppe blieb die Anzahl der „up“- und „down“-Sequenzen unverändert. Auch in dieser Phase bestanden bei diesem Tierstamm keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Behandlungsgruppen.

### 3.8.2 Sensitivität des Barorezeptor-Reflexes

Abbildung 3.17 zeigt die Steigung der Regressionsgeraden der Beziehung zwischen spontan auftretenden Blutdruck- und RR-Intervallschwankungen der „up“- und „down“-Sequenzen. Diese Steigung ist ein Maß der Sensitivität des Barorezeptor-Reflexes.

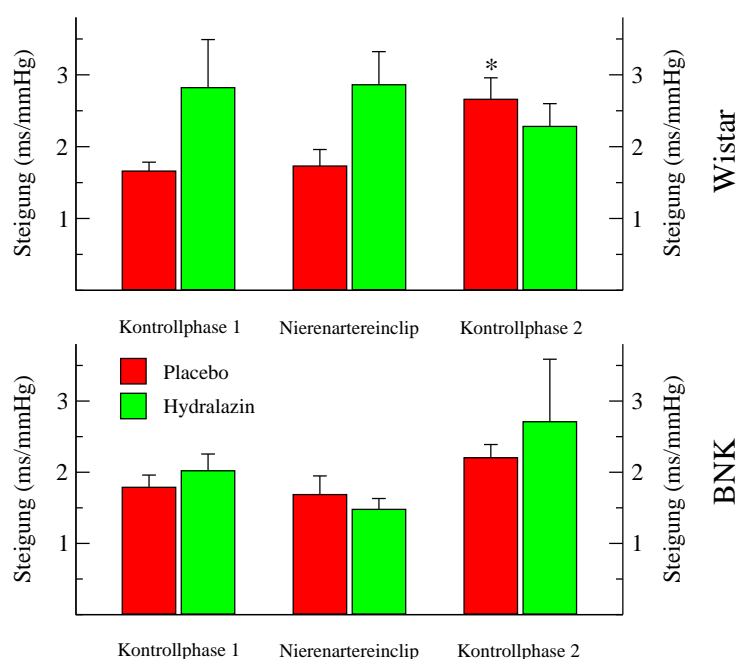


Abbildung 3.17: Steigung des Barorezeptor-Reflexes. In der oberen Graphik finden sich beide Behandlungsgruppen des Wistar-Tierstammes. Die untere Graphik zeigt entsprechende Werte der Brown-Norway-Katholiek-Tiere. Eine Behandlung mit Placebo ist in roter, eine mit Hydralazin in grüner Farbe dargestellt. X-Achse: Protokollphase, Y-Achse: Steigung. \*:  $p < 0,05$  im Vergleich zur ersten Kontrollphase.

Hinsichtlich der Sensitivität des Barorezeptor-Reflexes (BRR) bestanden über den gesamten Versuchszeitraum weder signifikante Unterschiede innerhalb der einzelnen Behandlungsgruppen noch zwischen den Behandlungsformen. Lediglich in der Kontrollphase 2 wiesen die mit Placebo behandelten Wistar-Tiere eine signifikante Erhöhung der BRR-Sensitivität auf.

Die Sensitivität des Barorezeptor-Reflexes war über den gesamten Versuchszeitraum zwischen beiden Tierstämmen nicht unterschiedlich.

## 3.9 Powerspektren des Blutdrucks

Die zu den in Abbildungen 3.5 bis 3.10 gezeigten Blutdruckaufnahmen korrespondierenden, autoregressiv berechneten Powerspektren finden sich in den folgenden vier Abbildungen 3.18 bis 3.21.

### 3.9.1 Wistar-Ratten

#### Placebobehandlung

Abbildung 3.18 zeigt die im vorangegangenen Abschnitt bereits gezeigten, originalen Blutdruckregistrierungen eines Wistar-Tieres aus der Kontrollgruppe mit den dazugehörigen, autoregressiv berechneten Powerspektren.

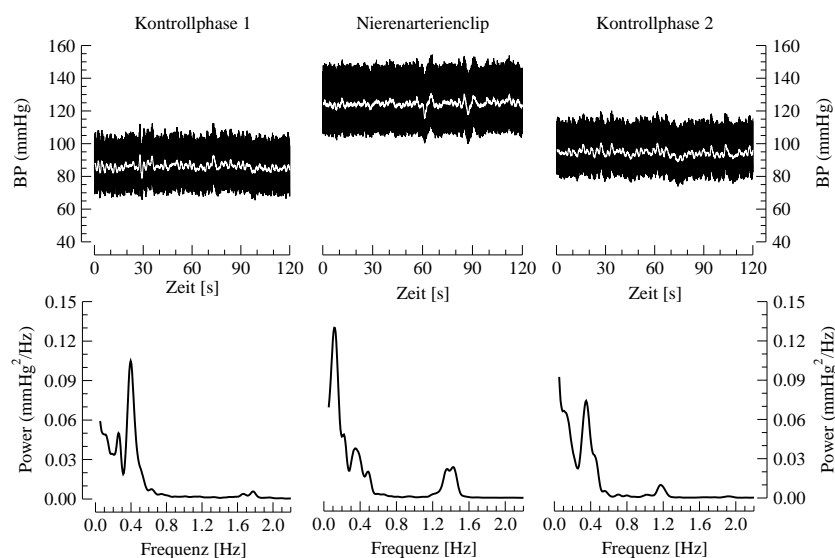


Abbildung 3.18: Originale Blutdruckregistrierungen mit dazugehörigen, autoregressiv berechneten Powerspektren einer Wistar-Ratte, die während der Clipphase mit Placebo behandelt wurde. X-Achse: Zeit (oben) bzw. Frequenz (unten), Y-Achse: Blutdruck (oben) bzw. spektrale Leistungsdichte (unten).

Mit der Implantation des Nierenarterienclips und daraus resultierendem Blutdruckanstieg unter der Placebobehandlung kam es in dieser Behandlungsgruppe zu einem signifikanten Zuwachs der  $LF_{BP}$ -Power, die nach Clipexplantation wieder auf das Ausgangsniveau (Kontrollphase 1) abfiel.

## Hydralazinbehandlung

Die Abbildung 3.19 zeigt die zuvor gezeigten, originalen Blutdruckregistrierungen zusammen mit den dazugehörigen Powerspektren eines während der Phase mit stimuliertem Renin-Angiotensin-System mit Hydralazin behandelten Versuchstieres aus dem Wistar-Tierstamm.

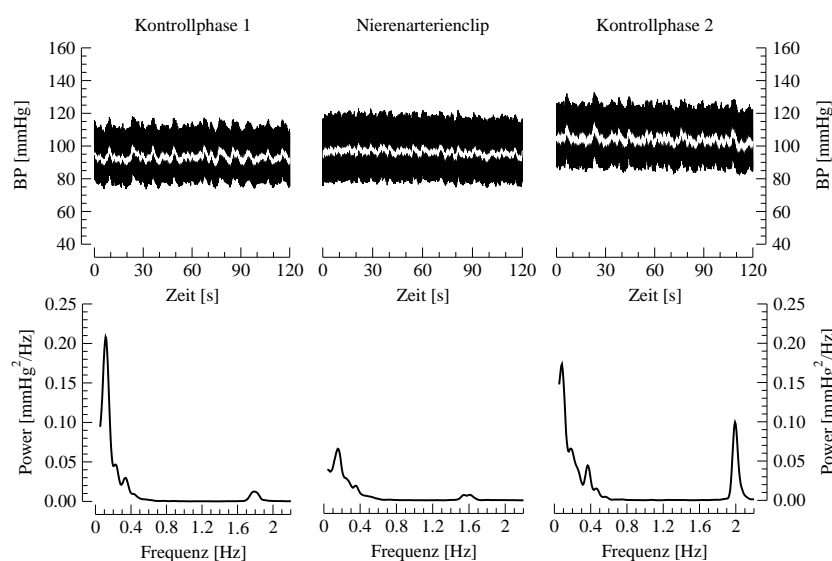


Abbildung 3.19: Originale Blutdruckaufzeichnungen mit dazugehörigen, autoregressiv berechneten Powerspektren einer während der Clipphase mit Hydralazin behandelten Wistar-Ratte zu allen drei Zeitpunkten des Protokolls. X-Achse: Zeit (oben) bzw. Frequenz (unten), Y-Achse: Blutdruck (oben) bzw. spektrale Leistungsdichte (unten).

Wiederum sind die im vorangegangenen Abschnitt gezeigten, exemplarischen Originalregistrierungen den oberen drei Graphiken zu entnehmen, die autoregressiv berechneten Powerspektren finden sich im unteren Teil der Abbildung.

Unter stimuliertem Renin-Angiotensin-System (Nierenarterienclip) und Behandlung mit Hydralazin konnte in dieser Gruppe ein Blutdruckanstieg im Vergleich zur ersten Kontrollphase verhindert werden. Die Power im niederfrequenten Bereich zeigte keine Änderung während dieser Phase.

In der ersten Woche nach Clipexplantation und Beendigung der Hydralazinbehandlung (Kontrollphase 2) kam es in dieser Versuchsgruppe zu einem signifikanten Blutdruckanstieg. Die mittlere Power des arteriellen Blutdrucks im niederfrequenten Bereich hingegen fiel signifikant ab und erreichte erst in der letzten Woche des Versuchs wieder das Ausgangsniveau.



### 3.9.2 Brown-Norway-Katholiek-Ratten

Die Blutdruckkurven mitsamt den dazugehörigen Powerspektren beider Behandlungsgruppen des BNK-Stammes finden sich in den Abbildungen 3.20 (Placebo) und 3.21 (Hydralazin).

#### Placebobehandlung

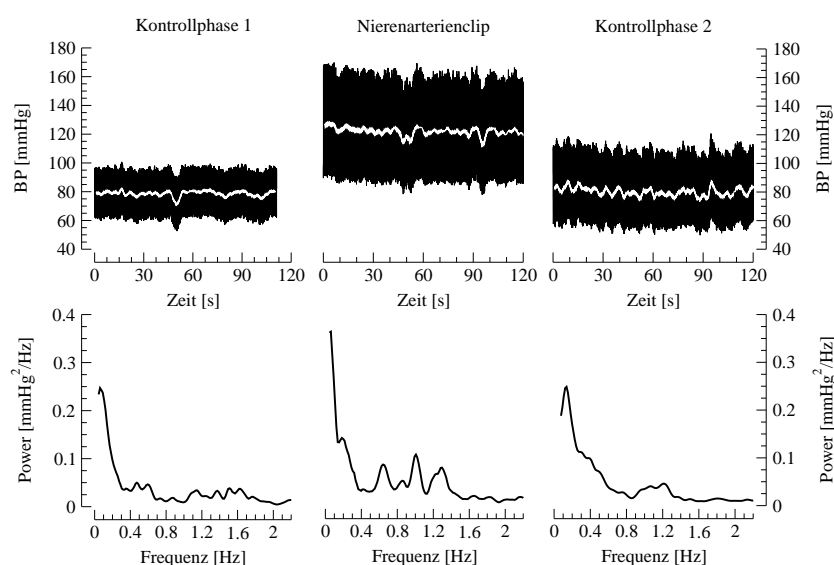


Abbildung 3.20: Originale Blutdruckaufzeichnungen mit autoregressiv berechneten Powerspektren einer während der Clipphase mit Placebo behandelten BNK-Ratte zu allen drei Zeitpunkten des Protokolls. X-Achse: Zeit (oben) bzw. Frequenz (unten), Y-Achse: Blutdruck (oben) bzw. spektrale Leistungsdichte (unten).

Die in der Abbildung 3.8 gezeigten Blutdruckregistrierungen eines Kontrolltieres aus dem BNK-Stamm sind erneut in den oberen drei Graphiken der Abbildung dargestellt. Die korrespondierenden, autoregressiv berechneten Powerspektren finden sich jeweils in den darunter gelegenen Diagrammen. Während der Phase mit renovaskulärer Hypertonie kam es bei dieser mit Placebo behandelten Gruppe zu einem signifikanten Anstieg der  $LF_{BP}$ -Power ( $p < 0,05$ ). Nach der Explantation des Nierenarterienclips fiel der Blutdruck unter erneuten Kontrollbedingungen wieder auf das Ausgangsniveau ab. Die  $LF_{BP}$ -Power befand sich in den ersten beiden Wochen dieser Phase im Vergleich zur ersten Kontrollwoche auf einem signifikant erhöhten Niveau.

## Hydralazinbehandlung

Als letztes sind die drei zuvor gezeigten exemplarischen Blutdruckregistrierungen mit dazugehörigen, autoregressiv berechneten Powerspektren eines Versuchstieres aus dem Brown-Norway-Katholiek-Tierstamm dargestellt. Während der Clipphase erfolgte in dieser Gruppe eine Behandlung mit Hydralazin.

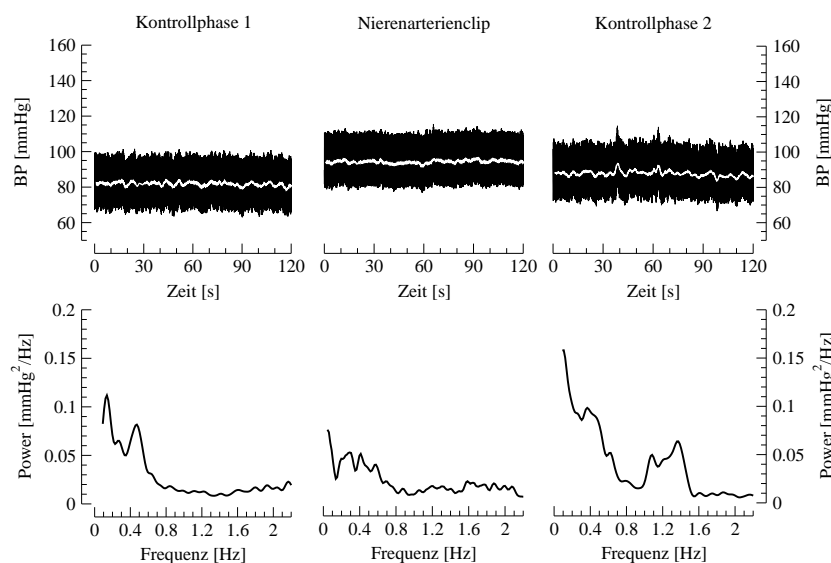


Abbildung 3.21: Originale Blutdruckaufzeichnungen mit korrespondierenden, autoregressiv berechneten Powerspektren einer während der Clipphase mit Hydralazin behandelten Brown-Norway-Katholiek-Ratte zu allen drei Zeitpunkten des Protokolls. X-Achse: Zeit (oben) bzw. Frequenz (unten), Y-Achse: Blutdruck (oben) bzw. spektrale Leistungsdichte (unten).

Unter stimuliertem Renin-Angiotensin-System (Nierenarterienclip) konnte in dieser Gruppe ein Blutdruckanstieg durch eine Behandlung mit Hydralazin abgeschwächt werden. Die Power im niederfrequenten Bereich zeigte ebenfalls eine im Vergleich zur ersten Kontrollphase abgeschwächte Zunahme der spektralen Leistungsdichte.

Nach der Explantation des Nierenarterienclips (Kontrollphase 2) waren die Blutdruckwerte lediglich in der ersten Woche unter erneuten Kontrollbedingungen signifikant erhöht. Ansonsten unterschieden sich die Blutdruckwerte in dieser Phase nicht von denen der ersten Versuchswoche. Die Power im niederfrequenten Bereich blieb während der gesamten Phase unter erneuten Kontrollbedingungen auf dem Ausgangsniveau.

### 3.9.3 Zeitverlauf der $LF_{BP}$ -Power

#### Höhenliniendiagramme der BP-Powerspektren

Die Abbildung 3.22 zeigt von allen Versuchsgruppen den Verlauf der Blutdruck-Power während des gesamten experimentellen Protokolls.

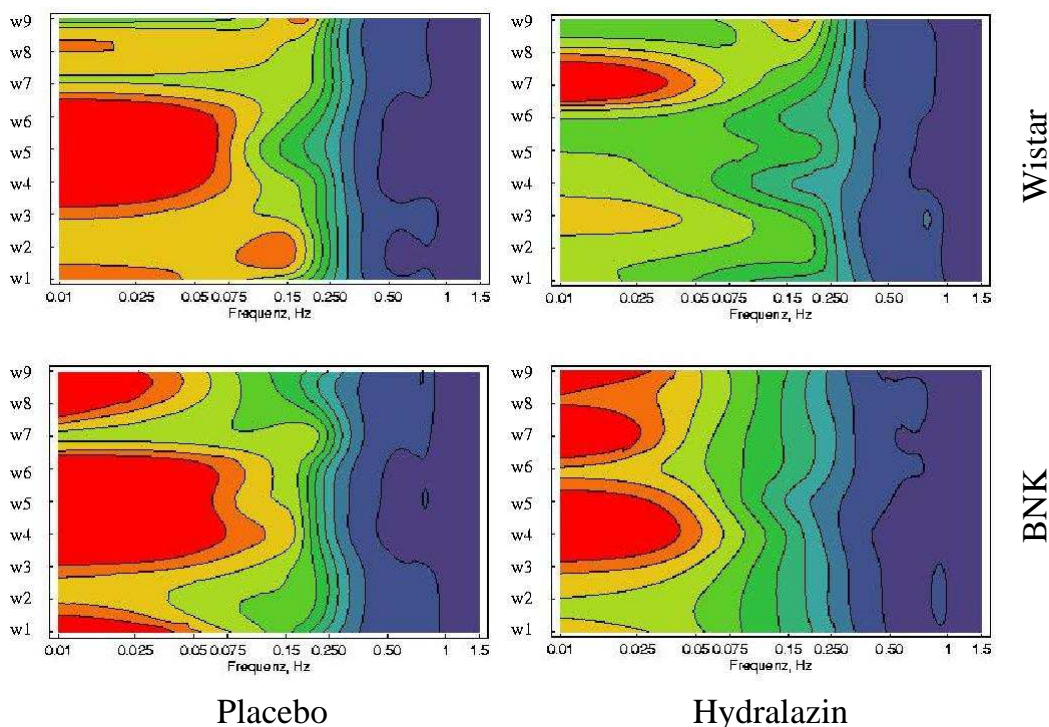


Abbildung 3.22: Höhenliniendiagramme der Powerspektren des Blutdrucks während der neun Versuchswochen. Hierbei handelt es sich um einen Querschnitt durch eine dreidimensionale Struktur, in diesem Falle durch die zeitlich aneinandergereihten Powerspektren. Auf beiden oberen Graphiken sind die Spektren der Wistar-Tiere dargestellt, auf beiden unteren die der BNK-Tiere. Die linken beiden Graphiken zeigen die Kontrollgruppen, beide rechten die Behandlungsgruppen mit Hydralazin. Anhand der Farbe ist die Intensität der Blutdruckpower ersichtlich. Dunkle Farben weisen auf eine kleine Power hin, helle Farben repräsentieren eine große Power. X-Achse: Frequenz, Y-Achse: Woche des Protokolls.

Bei den Höhenliniendiagrammen der spektralen Leistungsdichte des Blutdrucks fanden sich bei beiden mit Placebo behandelten Versuchsgruppen unter stimuliertem RAS stark erhöhte Powerwerte im Frequenzbereich zwischen 0.01 und 0.06 Hz. Mit der Powerzunahme im niederfrequenten Bereich ging eine Abnahme der  $MF_{BP}$ -Power einher. Unter normotensiven Blutdruckwerten zu Beginn und Ende des Experiments (W1-3 und W7-9) war in diesem Frequenzbereich keine wesentliche Aktivität meßbar.

Auch bei den während der Clipphase mit Hydralazin behandelten Versuchstieren aus dem BNK-Stamm nahm die Power unterhalb von 0.06 Hz stark zu. Sogar unter erneuten Kontrollbedingungen waren die Powerwerte in diesem Frequenzbereich noch erhöht. Bei der entsprechenden Behandlungsgruppe des Wistar-Tierstammes hingegen ließ sich unter stimuliertem RAS und normotensiven Blutdruckwerten keine Aktivität im Frequenzbereich zwischen 0.01 und 0.06 Hz messen.

### Wistar-Versuchsgruppen

In Abbildung 3.23 ist der Verlauf von  $LF_{BP}$ -Power und Blutdruckvariabilität (Varianz) beider Versuchsgruppen des Wistar-Stammes über den gesamten Versuchszeitraum dargestellt.

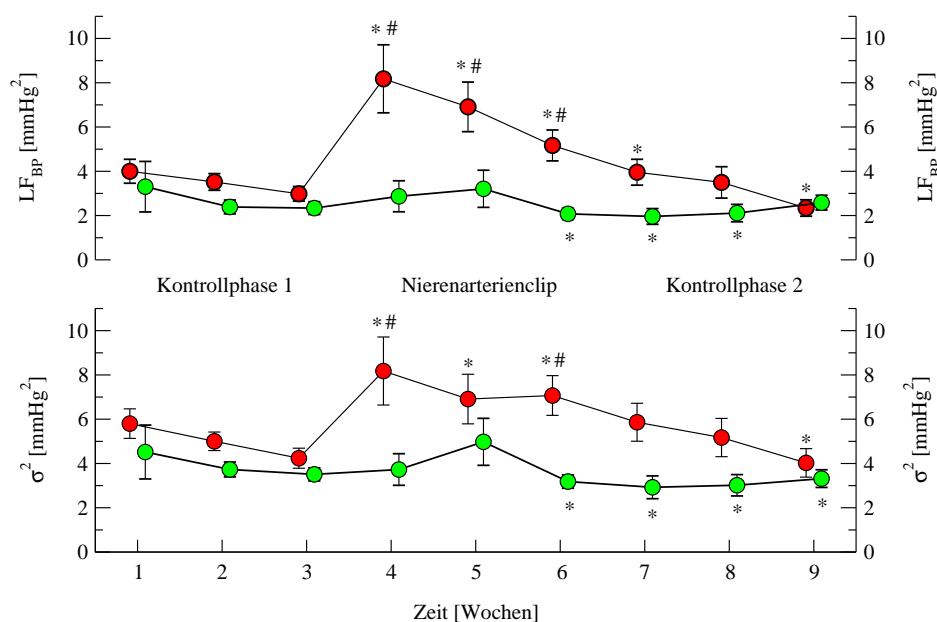


Abbildung 3.23: Zeitverlauf von  $LF_{BP}$ -Power (oben) und Blutdruckvariabilität (unten) beider Behandlungsgruppen des Wistar-Tierstammes (Placebo: rot, Hydralazin: grün). X-Achse: Zeit, Y-Achse:  $LF_{BP}$ -Power (oben) bzw. totale Variabilität (unten). \*:  $p < 0,05$  im Vergleich zur ersten Kontrollwoche, #:  $p < 0,05$  im Vergleich zwischen beiden Behandlungsgruppen.

Am Ende der ersten Kontrollphase betrug die  $LF_{BP}$ -Power in der Placebogruppe  $3.0 \pm 0.3 \text{ mmHg}^2$  und in der Hydralazingruppe  $2.4 \pm 0.3 \text{ mmHg}^2$ . Die Blutdruckvariabilität, ausgedrückt als Varianz, betrug  $4.2 \pm 0.5 \text{ mmHg}^2$  (Placebogruppe) bzw.  $3.5 \pm 0.3 \text{ mmHg}^2$  (Hydralazingruppe). Unter Ausgangsbedingungen fanden sich zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede innerhalb von  $LF_{BP}$ -Power und Varianz.

Mit Stimulation des Renin-Angiotensin-Systems und der daraus resultierenden renovaskulären Hypertonie in der Behandlungsgruppe mit Placebo kam es zu einem signifikanten Anstieg der  $LF_{BP}$ -Power von  $3.0 \pm 0.3 \text{ mmHg}^2$  auf  $8.2 \pm 1.5 \text{ mmHg}^2$  ( $p < 0,01$ ) und der Blutdruckvariabilität von  $4.2 \pm 0.5 \text{ mmHg}^2$  auf  $9.9 \pm 1.6 \text{ mmHg}^2$ . Sowohl die  $LF_{BP}$ -Power als auch die Variabilität waren in der mit Placebo behandelten Gruppe über den gesamten Zeitraum mit stimuliertem Renin-Angiotensin-System auf signifikant erhöhtem Niveau. Die Power fiel im Verlauf der Clipphase signifikant auf zuletzt  $5.2 \pm 0.7 \text{ mmHg}^2$  ab. Im Gegensatz hierzu fand sich bei den mit Hydralazin behandelten Tieren unter stimuliertem Renin-Angiotensin-System weder eine Zunahme der  $LF_{BP}$ -Power noch der Varianz. In der dritten Woche dieser Phase war bei den mit Hydralazin behandelten Tieren sogar eine signifikante Abnahme der LF-Power auf  $2.1 \pm 0.3 \text{ mmHg}^2$  und der Variabilität auf  $3.2 \pm 0.3 \text{ mmHg}^2$  zu verzeichnen.

Hinsichtlich der  $LF_{BP}$ -Power waren die Unterschiede zwischen beiden Behandlungsgruppen über den gesamten Zeitraum mit stimuliertem Renin-Angiotensin-System statistisch signifikant. In der ersten und dritten Woche der Phase mit stimuliertem RAS gab es signifikante Unterschiede in der Blutdruckvariabilität.

Nach der Explantation des Nierenarterienclips und Beendigung der RAS-Stimulation fiel die  $LF_{BP}$ -Power in der Kontrollgruppe während der ersten beiden Wochen unter erneuten Kontrollbedingungen auf das Ausgangsniveau ab. In der letzten Woche des Experiments war die  $LF_{BP}$ -Power im Vergleich zur ersten Kontrollwoche signifikant erniedrigt. Bei den zuvor mit Hydralazin behandelten Tieren blieben die  $LF_{BP}$ -Powerwerte in den ersten beiden Wochen nach Clip-explantation signifikant erniedrigt und erreichten in der letzten Woche unter erneuten Kontrollbedingungen wieder das Ausgangsniveau. Entsprechend dem Verlauf der  $LF_{BP}$ -Power fiel auch die Blutdruckvariabilität unter erneuten Kontrollbedingungen bei den zuvor mit Placebo behandelten Versuchstieren. Hier war analog der Abnahme der  $LF_{BP}$ -Power in der letzten Woche des Versuchs auch eine signifikant reduzierte Variabilität von  $4.0 \pm 0.6 \text{ mmHg}^2$  nachweisbar. Bei den zuvor mit Hydralazin behandelten Wistar-Ratten bestand über den gesamten Zeitraum nach Clipexplantation (Kontrollphase 2) eine signifikant erniedrigte Blutdruckvariabilität.

$LF_{BP}$ -Power und Blutdruckvariabilität beider Behandlungsgruppen unterschieden sich zu keinem Zeitpunkt unter erneuten Kontrollbedingungen signifikant voneinander.

### Brown-Norway-Katholiek-Versuchsgruppen

Abbildung 3.24 zeigt den Verlauf von  $LF_{BP}$ -Power und Blutdruckvariabilität (Varianz) beider Behandlungsgruppen des Brown-Norway-Katholiek-Tierstammes während der drei Versuchsphasen.

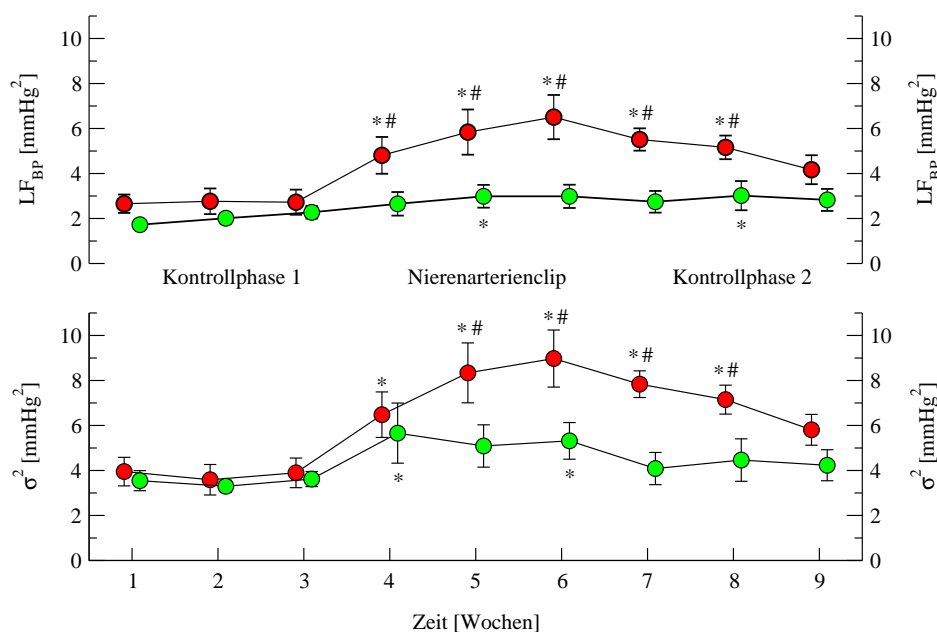


Abbildung 3.24: Zeitverlauf von  $LF_{BP}$ -Power (oben) und Blutdruckvariabilität (unten) bei der Behandlungsgruppen des BNK-Stammes (Placebo: rot, Hydralazin: grün). X-Achse: Zeit, Y-Achse:  $LF_{BP}$ -Power (oben) bzw. totale Variabilität (unten). \*:  $p < 0,05$  im Vergleich zur ersten Kontrollwoche, #:  $p < 0,05$  im Vergleich zwischen beiden Behandlungsgruppen.

Wie bei beiden Versuchsgruppen des Wistar-Tierstammes bestanden auch bei beiden Behandlungsgruppen aus dem BNK-Stamm unter initialen Kontrollbedingungen keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der  $LF_{BP}$ -Power und Blutdruckvariabilität.

Mit der Implantation des Nierenarterienclips kam es bei den mit Placebo behandelten Tieren zu einem signifikanten Anstieg sowohl der  $LF_{BP}$ -Power als auch der Blutdruckvariabilität. Bei den während dieser Phase mit Hydralazin behandelten Tieren stieg der Blutdruck unter stimuliertem RAS trotz blutdrucksenkender Medikation ebenfalls signifikant an. Hier fand sich im Gegensatz zur entsprechenden Behandlungsgruppe des Wistar-Stammes ein Anstieg der  $LF_{BP}$ -Power, der in der zweiten Woche signifikant war. In der ersten und letzten Woche dieser Phase war auch die Blutdruckvariabilität signifikant erhöht.

In allen drei Wochen dieser Phase war die  $LF_{BP}$ -Power zwischen beiden Behandlungsgruppen signifikant unterschiedlich. Bezüglich der Blutdruckvariabilität unterschieden sich beide Gruppen ab der zweiten Woche unter den Bedingungen mit stimuliertem Renin-Angiotensin-System.

Nach der Explantation des Nierenarterienclips persistierten  $LF_{BP}$ -Power und Blutdruckvariabilität bei den zuvor mit Placebo behandelten Tieren in den ersten beiden Wochen dieser Phase auf signifikant erhöhtem Niveau. Sie fielen erst in der letzten Woche unter erneuten Kontrollbedingungen wieder auf das Ausgangsniveau ab. Bei den mit Hydralazin behandelten Tieren bestand nach der Clipexplantation lediglich in der zweiten Woche unter erneuten Kontrollbedingungen eine signifikant erhöhte  $LF_{BP}$ -Power von  $3.0 \pm 0.6 \text{ mmHg}^2$ . Ansonsten waren  $LF_{BP}$ -Power und Varianz bei den zuvor mit Hydralazin behandelten Tieren in der zweiten Kontrollphase unverändert zu Ausgangsbedingungen (Kontrollwoche 1).

Zwischen beiden Behandlungsgruppen bestand innerhalb der ersten beiden Wochen unter erneuten Kontrollbedingungen eine signifikant unterschiedliche  $LF_{BP}$ -Power und Blutdruckvariabilität.

### 3.9.4 Gesamtes Powerspektrum

#### Wistar- und Brown-Norway-Katholiek-Tierstamm

Abbildung 3.25 stellt für jede Behandlungsgruppe die für jeden Frequenzbereich gemittelten, absoluten Powerwerte des Blutdrucks während der drei Protokollphasen dar.

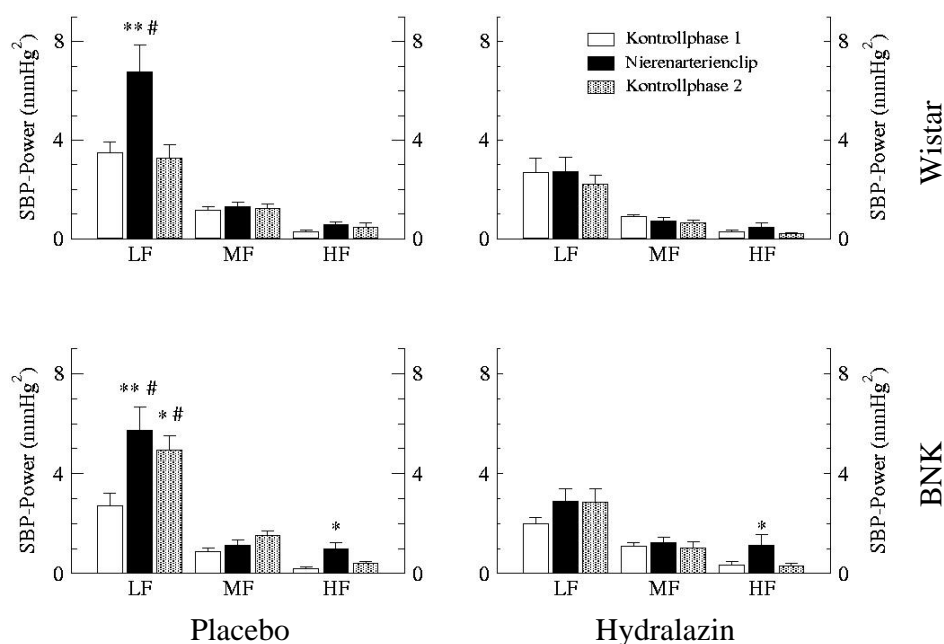


Abbildung 3.25: Powerspektren aller Versuchsgruppen im LF- (0.02-0.2 Hz), MF- (0.2-0.6 Hz) und HF-Bereich (1 Hz) in jeder Versuchsphase. In jedem Frequenzbereich gibt der erste Balken den Mittelwert der BP-Power während der ersten Kontrollphase an, der mittlere Balken den während der Clippphase und der dritte Balken den Mittelwert nach Clipexplantation. Im oberen Teil sind beide Versuchsgruppen des Wistar-, im unteren die des BNK-Stammes abgebildet. Die Kontrollgruppen (Placebobehandlung) sind in den linken beiden und die Hydralazingruppen in den rechten beiden Graphiken zu finden. X-Achse: Frequenzbereich, Y-Achse: SBP-Power. \*:  $p < 0,05$  und \*\*:  $p < 0,01$  im Vergleich zur ersten Kontrollphase, #:  $p < 0,05$  im Vergleich zur korrespondierenden Behandlungsgruppe.

In der Kontrollgruppe des Wistar-Tierstammes kam es im LF-Bereich während der Clippphase zu einem signifikanten Anstieg der BP-Power von  $3.5 \pm 0.4$  auf  $6.8 \pm 1.1 \text{ mmHg}^2$ . Nach der Explantation des Clips und Beendigung der renovaskulären Hypertonie erreichte die systolische BP-Power mit  $3.3 \pm 0.6 \text{ mmHg}^2$  wieder das Ausgangsniveau der ersten Kontrollphase.



Bei den mit Hydralazin behandelten Tieren des Wistar-Stammes gab es weder während der Clipphase unter stimuliertem Renin-Angiotensin-System noch während der zweiten Kontrollphase signifikante Änderungen der  $LF_{BP}$ -Power. Im MF- und HF-Bereich bestanden bei beiden Behandlungsgruppen des Wistar-Tierstammes über den gesamten Versuchszeitraum keine signifikanten Änderungen der Power.

Der Verlauf der BP-Power bei den Versuchstieren des BNK-Tierstammes ähnelte dem der Wistar-Tiere. In der mit Placebo behandelten Gruppe kam es unter stimuliertem Renin-Angiotensin-System und hypertensiven Blutdruckwerten ebenfalls zu einem signifikanten Anstieg der  $LF_{BP}$ -Power von  $2.7 \pm 0.5 \text{ mmHg}^2$  auf  $5.7 \pm 0.9 \text{ mmHg}^2$ . Hier war die  $LF_{BP}$ -Power jedoch mit  $4.9 \pm 0.6 \text{ mmHg}^2$  auch nach Beendigung der Clipphase noch signifikant erhöht.

In der mit Hydralazin behandelten Versuchsgruppe des Brown-Norway-Katholiek-Tierstammes fehlte dieser Anstieg der  $LF_{BP}$ -Power sowohl unter stimuliertem Renin-Angiotensin-System als auch nach Clipexplantation und Beendigung der RAS-Stimulation.

Bei beiden Behandlungsgruppen des BNK-Tierstammes fand sich unter stimuliertem RAS eine signifikante Zunahme der  $HF_{BP}$ -Power. Die  $MF_{BP}$ -Power zeigte – wie auch bei den entsprechenden Gruppen des Wistar-Stammes – keine signifikanten Änderungen.

### 3.9.5 Doppelt-transgene Sprague-Dawley-Ratten

#### Absolute Powerspektren

Die Abbildung 3.26 zeigt die Absolutwerte der spektralen BP-Power der transgenen SD-Ratten vor und während der Infusion mit NaNP sowie von den WT-Kontrolltieren.

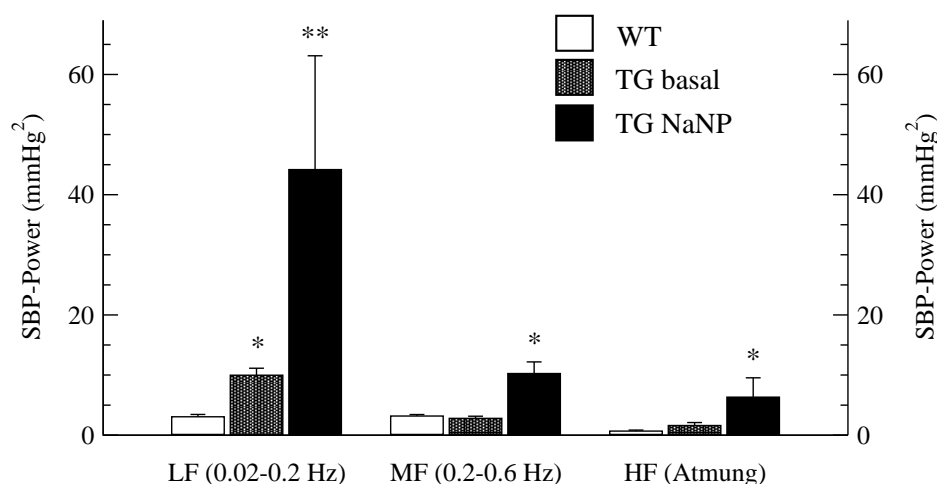


Abbildung 3.26: Absolute Power des Blutdrucks im LF-, MF- und HF-Bereich bei transgenen SD-Ratten und WT-Kontrolltieren. Der linke Balken jedes Frequenzbereichs zeigt die absolute Power der Wildtyp-Kontrolltiere (WT), der mittlere die der transgenen Ratten unter basalen Bedingungen (TG basal) und der rechte die während der Applikation von NaNP (TG NaNP). X-Achse: Frequenzbereich, Y-Achse: Absolute SBP-Power \*:  $p < 0,05$  und \*\*:  $p < 0,01$  im Vergleich zu Wildtyp-Kontrolltieren.

Die transgenen Ratten wiesen bereits unter basalen Bedingungen eine signifikant erhöhte systolische Blutdruck-Power im niederfrequenten Frequenzbereich (0.02–0.2 Hz) auf, die durch die Infusion mit Natrium-Nitroprussid (NaNP) noch deutlich gesteigert werden konnte. Weiterhin auffällig waren bei den Tieren unter Infusionsbehandlung stark erhöhte Power-Werte sowohl im MF- als auch im HF-Bereich. Dies deutete auf eine unspezifische Zunahme der Blutdruckvariabilität hin.

### Relative Powerspektren

Bei der Betrachtung der relativen spektralen BP-Power (s. Abb. 3.27) wurde die absolute Power in jedem Frequenzbereich auf die gesamte Power normiert und in Prozent dargestellt.

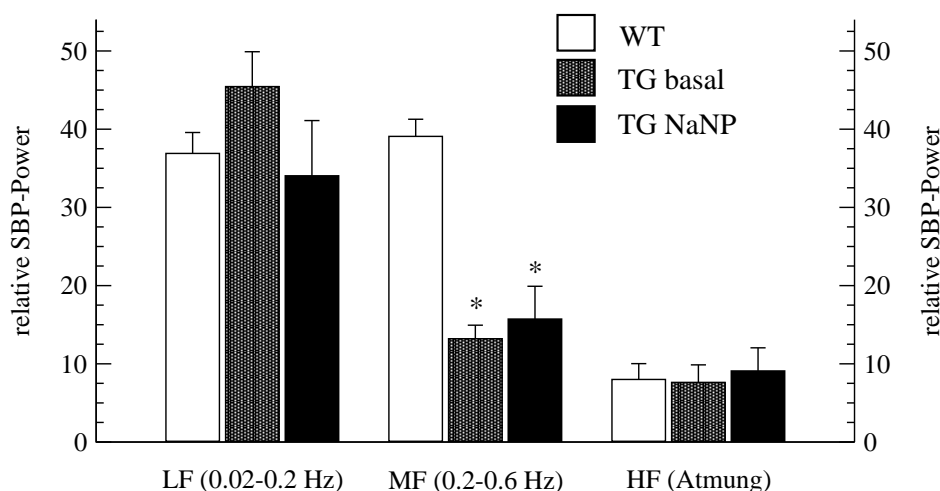


Abbildung 3.27: Relatives Powerspektrum im LF-, MF- und HF-Bereich bei transgenen Ratten und Wildtyp-Tieren. Der erste Balken jedes Frequenzbereiches zeigt das relative Powerspektrum des Wildtyps (WT), der mittlere Balken das der transgenen Ratten unter Basalbedingungen (TG basal) und der rechte Balken das während der Applikation von NaNP (TG NaNP). X-Achse: Frequenz, Y-Achse: Relative SBP-Power \*:  $p < 0,05$  und \*\*:  $p < 0,01$  im Vergleich zum Wildtyp.

Mit einem Anteil von  $45.4 \pm 4.5$  % am Powerspektrum war der  $LF_{BP}$ -Bereich bei den doppelt-transgenen Versuchstieren der dominierende Frequenzbereich unter Basalbedingungen.

Mit einem Anteil von  $36.9 \pm 2.7$  % unterschied sich der niederfrequente Bereich bei den Wildtyp-Kontrolltieren nicht vom mittelfrequenten Bereich ( $39.1 \pm 2.2$  %).

Obwohl der absolute Wert der  $LF_{BP}$ -Power bei den transgenen Tieren unter Infusion mit Natrium-Nitroprussid (NaNP) signifikant anstieg, zeigten sich im relativen Powerspektrum im Vergleich zu Basalbedingungen keine Unterschiede. Dies ist darauf zurückzuführen, daß die Zunahme der absoluten Power alle drei Frequenzbereiche gleichermaßen betraf. Im mittelfrequenten Bereich (0.2 – 0.6 Hz) fand sich bei den genetisch veränderten Tieren basal und unter der Infusionsbehandlung mit NaNP eine signifikant erniedrigte relative BP-Power im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrolltieren.

Der vor allem die atemsynchronen Schwankungen der Herzfrequenz und des Schlagvolumens widerspiegelnde hochfrequente Frequenzbereich stellte in allen drei Versuchsgruppen mit knapp 10 % den geringsten Anteil im relativen Powerspektrum dar. In diesem Frequenzbereich bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp-Kontrolltieren und transgenen Ratten während der Ausgangsbedingungen und der Infusion von NaNP.

### 3.10 Powerspektren der Herzfrequenz

Abbildung 3.28 zeigt den Verlauf der HF-Powerspektren von allen Versuchsgruppen in Form von Höhenliniendiagrammen.

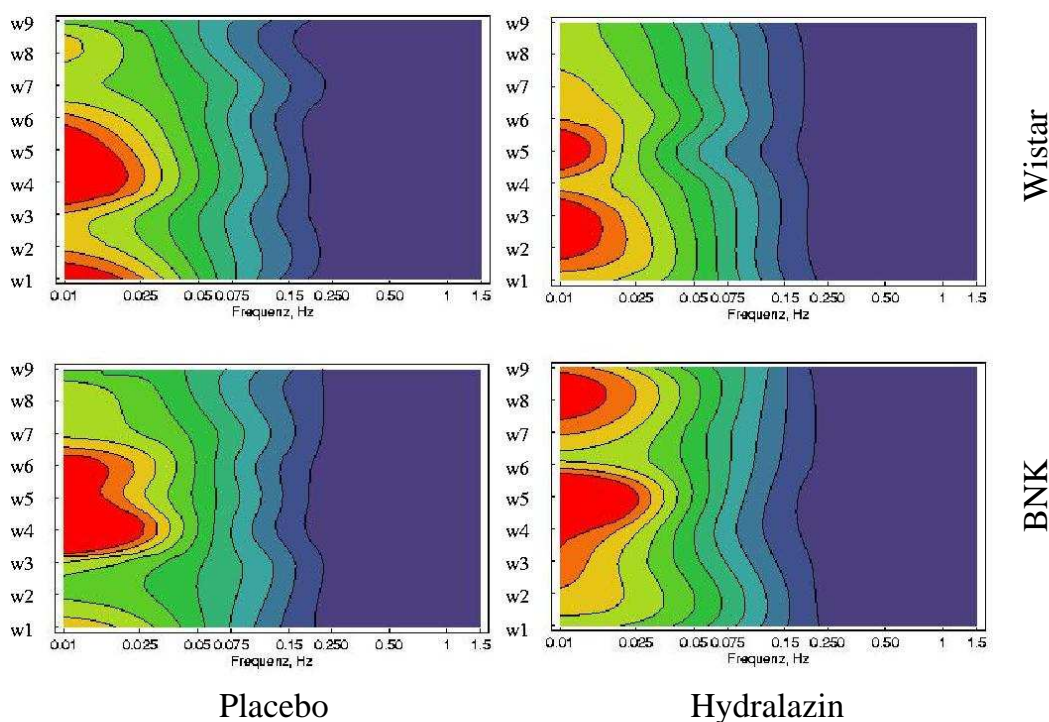


Abbildung 3.28: Höhenliniendiagramme der HF-Powerspektren. Die beiden oberen Diagramme stellen den Verlauf der Power bei den Wistar-Tieren dar, die unteren den der BNK-Tiere. Die linken Graphiken zeigen beide Kontrollgruppen (Placebobehandlung), die rechten die alternativen Behandlungsgruppen mit Hydralazin. Anhand der Farbe ist die Intensität der HF-Power ersichtlich. Rote Areale weisen auf starke Powerwerte hin, Blautöne repräsentieren eine niedrige Power. X-Achse: Frequenz, Y-Achse: Woche des Protokolls.

Im Gegensatz zur BP-Power nahm die  $LF_{HF}$ -Power (0.02–0.2 Hz) unter Bedingungen mit stimuliertem RAS bei beiden mit Placebo behandelten Gruppen nicht signifikant zu. Unter aktiviertem Renin-Angiotensin-System war jedoch eine Zunahme der Power im sehr niederfrequenten Bereich unterhalb von 0.02 Hz zu verzeichnen. Diese verstärkte Power fand sich ebenso bei beiden Behandlungsgruppen mit Hydralazin und war damit in allen Versuchsgruppen nachweisbar.

### 3.11 Korrelation zwischen $LF_{BP}$ -Power und BP

Um den Zusammenhang zwischen  $LF_{BP}$ -Power und Blutdruck besser erfassen und beurteilen zu können, wurde die Korrelation zwischen beiden Parametern berechnet und die Verteilung graphisch dargestellt (s. Abb. 3.29 und 3.30).

#### 3.11.1 Wistar-Ratten

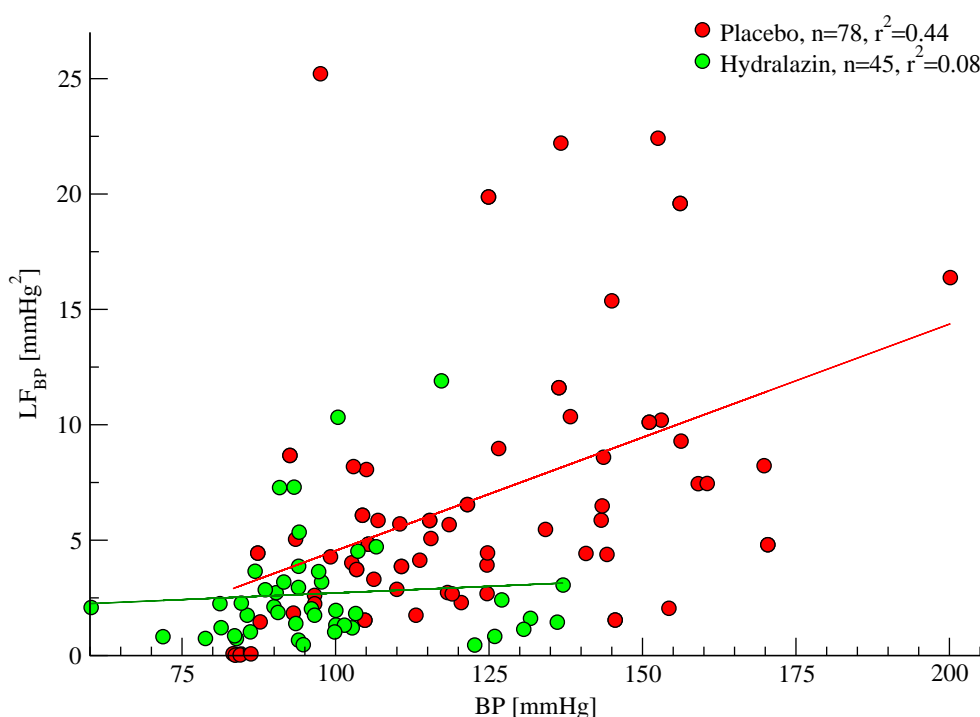


Abbildung 3.29: Korrelation zwischen  $LF_{BP}$ -Power und Blutdruck bei beiden Behandlungsgruppen des Wistar-Tierstammes. Die Werte aller Versuchsphasen wurden hierfür gepoolt. Rote Kreise kennzeichnen eine Behandlung mit Placebo ( $n=78$ ), grüne eine mit Hydralazin ( $n=45$ ). X-Achse: Blutdruck, Y-Achse:  $LF_{BP}$ -Power.

Bei den Kontrolltieren des Wistar-Tierstammes (Placebobehandlung) bestand mit einem Korrelationskoeffizienten  $r^2$  von 0.44 ein deutlicher Zusammenhang zwischen der  $LF_{BP}$ -Power und den Blutdruckwerten. Dieser Zusammenhang fehlte bei den Versuchstieren mit Hydralazinbehandlung ( $r^2 = 0.08$ ).

### 3.11.2 Brown-Norway-Katholiek-Ratten

Das folgende Korrelationsdiagramm 3.30 stellt die  $LF_{BP}$ -Power für beide Versuchsgruppen des Brown-Norway-Katholiek-Tierstammes in Abhängigkeit des Blutdrucks dar.

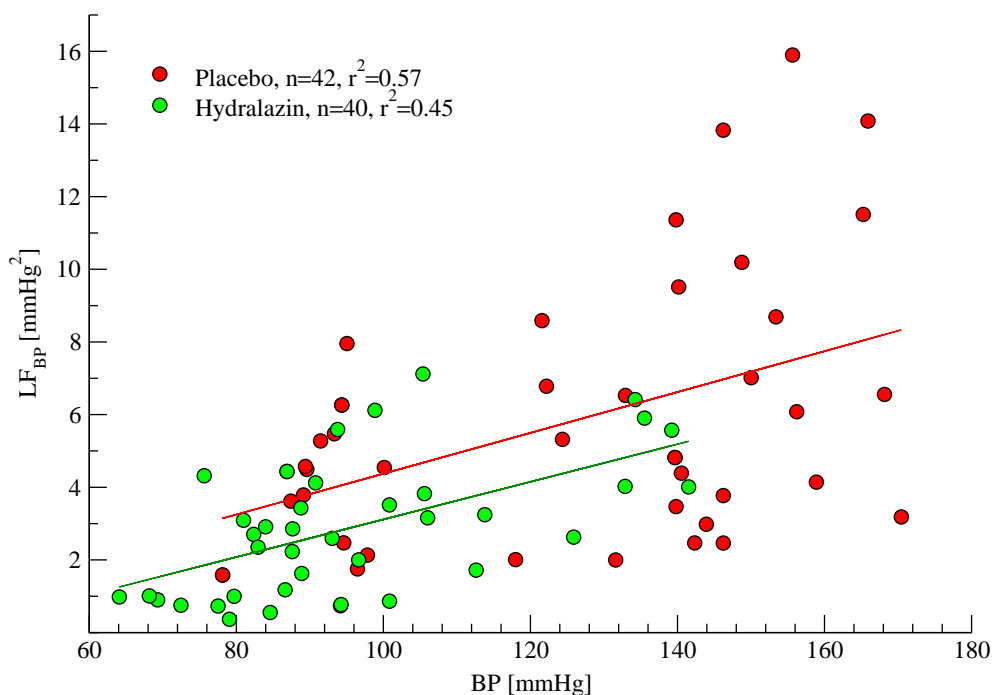


Abbildung 3.30: Korrelation zwischen  $LF_{BP}$ -Power und Blutdruck bei beiden Behandlungsgruppen des BNK-Tierstammes. Die Werte aller Versuchsphasen wurden hierfür gepoolt. Die Behandlungsgruppe mit Placebo ist anhand roter (n=42), die mit Hydralazin anhand grüner (n=40) Kreise erkennbar. X-Achse: Blutdruck, Y-Achse:  $LF_{BP}$ -Power.

Bei den Versuchstieren des BNK-Stammes bestand in der Kontrollgruppe (Placebobehandlung) mit einem Korrelationskoeffizienten von  $r^2=0.57$  ein starker linearer Zusammenhang zwischen der  $LF_{BP}$ -Power und der Höhe des Blutdrucks.

Auch in der Behandlungsgruppe mit Hydralazin bestand mit einem Korrelationskoeffizienten  $r^2$  von 0.45 ein deutlicher Zusammenhang zwischen beiden Parametern.

# Kapitel 4

## Diskussion

Die Ergebnisse dieser Studie legen die Annahme nahe, daß die Zunahme der  $LF_{BP}$ -Power bei einer experimentell induzierten und auf einer chronischen Stimulation des Renin-Angiotensin-Systems beruhenden Goldblatt-Hypertonie nicht primär auf einer Aktivierung des RAS beruht, sondern sekundär Folge einer durch die Stimulation des RAS bedingten Blutdruckerhöhung ist.

Folgende Resultate belegen diese These und sprechen gegen die bisherige Annahme, daß der niederfrequente Bereich des arteriellen Powerspektrums ein Aktivitätsmarker des Renin-Angiotensin-Systems ist:

- Unveränderte  $LF_{BP}$ -Power unter stimuliertem Renin-Angiotensin-System im Vergleich zu Kontrollbedingungen bei der mit Hydralazin medikamentös auf normotensive Blutdruckwerte eingestellten Versuchsgruppe des Wistar-Tierstammes.
- Deutliche Korrelation zwischen  $LF_{BP}$ -Power und arteriellem Blutdruck bei beiden mit Placebo behandelten Versuchsgruppen mit einem Korrelationskoeffizienten von 0.44 bei den Wistar- und 0.57 bei den BNK-Ratten.
- Unveränderte relative Power im niederfrequenten Bereich des arteriellen Powerspektrums bei den doppelt-transgenen Sprague-Dawley-Ratten, die eine auf einer exzessiven RAS-Aktivierung beruhende Hypertonie aufweisen.



Schon seit längerem ist bekannt, daß Blutdruck, Herzfrequenz und andere hämodynamische Parameter von Herzschlag zu Herzschlag schwanken. Diese sogenannte „beat-to-beat“-Variabilität wurde bereits im 18. Jahrhundert bei den ersten quantitativen Messungen des arteriellen Blutdrucks am Pferd durch Stephen Hales registriert [52]. Hales beobachtete erstmals, daß ein Zusammenhang zwischen Atmung, Höhe des Blutdrucks und der Zeit zwischen zwei Herzschlägen besteht.

Dieses Phänomen wurde lange Zeit als „normale Sinusarrhythmie“ angesehen und als Zeichen eines gesunden kardiovaskulären Systems bewertet. Dementsprechend gab es kaum Bemühungen, die zugrundeliegenden physiologischen Mechanismen, die diese Schwankungen von Blutdruck und Herzfrequenz generieren, aufzuschlüsseln und mathematisch zu charakterisieren. Erste aufschlußreiche Untersuchungen zu möglichen Einflüssen des autonomen Nervensystems auf die Herzfrequenz erfolgten 1962 durch Warner und Cox [122]. Mittels eines mathematischen Modells berechneten sie die zu erwartenden Frequenzveränderungen und -verläufe bei unterschiedlichen Stimulationsfrequenzen von Sympathikus und Parasympathikus. Sie verglichen die errechneten Verläufe mit den tatsächlich nach vagaler und sympathischer Stimulation am denervierten Herzen des Hundes registrierten Kurven. Sie stellten fest, daß eine Antwort des kardiovaskulären Systems auf parasympathische Reize wesentlich schneller erfolgte, als auf sympathische. Sie fanden heraus, daß nur das parasympathische Nervensystem schnell genug agieren kann, um Blutdruck- und Herzfrequenzschwankungen im mittel- und hochfrequenten Bereich des Powerspektrums zu verursachen. Die Organe sind laut Warner und Cox lediglich auf einem relativ begrenzten Frequenzniveau kleiner 0.1 Hz in der Lage, auf das sympathische Nervensystem reagieren zu können [122]. Diese Ergebnisse konnten in den darauffolgenden Jahren durch andere Forschergruppen bestätigt werden [2, 3, 11, 28, 58, 72, 81, 83, 84, 86, 110, 111].

Sympathikus und Parasympathikus sind die beiden großen Hauptsäulen in der kurzfristigen – innerhalb von Sekunden bis Minuten stattfindenden – Regulation der kardiovaskulären Homöostase. Über Presso- und Chemorezeptoren werden afferente Impulse dem medullären, rhombencephalen Kreislaufzentrum und dem Atemzentrum in der Medulla oblongata zugeleitet. Über efferente Bahnen erfolgt sowohl eine Steuerung der Herzfunktion (Ino-, Chrono-, Dromo- und Bathmotropie) als auch des Gefäßwiderstands und der Atmung. 1973 vermutete Gutman erstmals, daß das Renin-Angiotensin-System als weiteres Regulationssystem in der kurzfristigen Regulation der Blutdruck- und Herzfrequenzvariabilität eine Rolle spielen könne [50].

Wieder aufgegriffen wurde die Analyse der an der Homöostase beteiligten Regulationssysteme Anfang der achtziger Jahre durch eine Arbeitsgruppe um Richard Cohen. Diese Gruppe benutzte hierbei die auf einer Fourier-Transformation basierende Powerspektralanalyse als mathematische Methode zur Analyse von Blutdruck und Herzfrequenz [3]. Zur Ermittlung der Systeme, die an der autonomen Gegenregulation von physiologischen Veränderungen von Blutdruck, Herzfrequenz und Gefäßtonus von Schlag zu Schlag beteiligt sind, führte S. Akselrod eine tierexperimentelle Studie an vier Hunden durch. Medikamentös wurden Bestandteile des autonomen Nervensystems (Sympathikus und Parasympathikus) sowie das Renin-Angiotensin-System selektiv geblockt und die hierdurch hervorgerufenen Auswirkungen auf das Powerspektrum untersucht. Eine Blockade des Parasympathikus mit Glycopyrrolat führte hier zu einem Verschwinden des mittel- und hochfrequenten Peaks des Powerspektrums, während die Amplitude des Peaks im niederfrequenten Bereich abnahm. Eine gleichzeitige, kombinierte Blockade von Sympathikus und Parasympathikus bewirkte einen Verlust aller Schwankungen des Herzfrequenzspektrums. Durch eine selektive Blockade des Renin-Angiotensin-Systems ließ sich bei den drei in die Analyse einbezogenen Hunden ein Anstieg der  $LF_{BP}$ -Power um den Faktor 2 - 4.5 erzielen. In dem Ergebnis sahen die Forscher den ersten direkten Beweis dafür, daß das Renin-Angiotensin-System eine signifikante Rolle bei der kurzfristigen Regulation der Homöostase spielt.

In einem Folgeexperiment konnte die Arbeitsgruppe um R. Cohen zeigen, daß Herzfrequenzschwankungen im niederfrequenten Bereich eine kompensatorische Folge von Blutdruckschwankungen sind. Diese wiederum resultieren aus Änderungen des peripheren Vasomotorentonus, die durch das RAS abgepuffert werden [2].

Vorangegangene Studien hatten zeigen können [85, 86, 87], daß eine durch eine einseitige Nierenarterienstenose induzierte und über eine Stimulation des RAS vermittelte renovaskuläre Hypertonie mit einer signifikanten Zunahme der  $LF_{BP}$ -Power verbunden ist.

Um den Einfluß eines aktivierten RAS auf das Powerspektrum beurteilen zu können, führten Ponchon et al. tierexperimentelle Versuche an männlichen Wistar-Ratten durch. In einer ersten Operation wurde den Tieren zur Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems ein Nierenarterienclip implantiert. Scheinoperierte Tiere dienten als Kontrollen. Drei Wochen nach dieser Intervention erfolgten hämodynamische Messungen am wachen Tier. Um den Einfluß des Renin-Angiotensin-Systems auf das Powerspektrum des Blutdrucks und der Herzfrequenz ermitteln zu können, wurde dieses Hormonsystem durch den  $AT_1$ -Rezeptorantagonisten Losartan blockiert. Im Vergleich zu den scheinoperierten Tieren kam es unter stimuliertem Renin-Angiotensin-System zu einem signifikanten Blutdruckanstieg. Durch intravenöse Applikation von Losartan wurde der

Blutdruck in diesem Akutversuch gesenkt. Hierbei kam es zu einer wahrscheinlich reflektorisch bedingten Tachykardie. Bei der Frequenzanalyse fand sich bei den Versuchstieren mit renovaskulärer Hypertonie eine signifikante Erhöhung der  $LF_{BP}$ -Power im Vergleich zu den Kontrolltieren bei nicht signifikantem Anstieg der  $MF_{BP}$ -Power. Losartan führte zu einem signifikanten Abfall der  $LF_{BP}$ -Power bei jedoch auch signifikant erniedrigten Blutdruckwerten. Im Powerspektrum wurde unter der Gabe von Losartan ein signifikanter Anstieg der  $MF_{BP}$ -Power verzeichnet.

Da der durch eine renovaskuläre Hypertonie hervorgerufene Anstieg der  $LF_{BP}$ -Power medikamentös durch den  $AT_1$ -Antagonisten Losartan rückgängig gemacht werden konnte, folgerten die Autoren daraus, daß Blutdruckschwankungen im niederfrequenten Bereich des Powerspektrums durch das Renin-Angiotensin-System hervorgerufen werden.

Auffällig bei dem von P. Ponchon erhobenen Hauptbefund, daß eine verstärkte Aktivität des Renin-Angiotensin-Systems an einer Zunahme der  $LF_{BP}$ -Power abgelesen werden kann, ist die Konkordanz zwischen (1) aktiviertem Renin-Angiotensin-System, (2) der Entwicklung von hypertensiven Blutdruckwerten und (3) der verzeichneten Zunahme der  $LF_{BP}$ -Power.

Hierbei wurde nicht berücksichtigt, daß durch die medikamentöse Behandlung mit Losartan neben einer Blockade des RAS auch gleichzeitig der Blutdruck auf ein normotensives Druckniveau gesenkt wurde. Eine Zunahme der  $LF_{BP}$ -Power bei chronisch aktiviertem RAS konnte somit nur unter hypertensiven Blutdruckwerten beobachtet werden. Die Überlegung und Frage danach, welchen Einfluß ein stimuliertes RAS auf das Powerspektrum des arteriellen Blutdrucks unter normotensiven Druckwerten ausübt, wurde bislang nur in Akutversuchen untersucht [15, 101]. In diesen Versuchen induzierten Elghozi et al. akut eine milde Stimulation der Reninfreisetzung durch eine suprarenale Infusion des  $\beta_1$ -Rezeptoragonisten Isoprenalin. Hierbei wurden ansteigende Konzentrationen von Isoprenalin verwendet, die zwar eine signifikant verstärkte Reninfreisetzung verursachten, hierbei aber das Blutdruckniveau unbeeinflusst ließen. In diesen Studien fand sich ein signifikanter Anstieg der  $LF_{BP}$ -Power (0.02 - 0.2 Hz) unter verstärkter,  $\beta_1$ -adrenerg vermittelter Reninfreisetzung. Dieser Anstieg der  $LF_{BP}$ -Power konnte durch Vorbehandlung mit dem  $AT_1$ -Rezeptorsubtypantagonisten Losartan aufgehoben werden.

Aus diesen Ergebnissen folgerten die Forscher, daß eine milde Zunahme der Reninaktivität, die keine Blutdruckänderung bewirkt, zu einer Zunahme der Blutdruckvariabilität im niederfrequenten Bereich führt. Sie konnten somit zeigen, daß eine akute Stimulation des Renin-Angiotensin-Systems unabhängig vom Blutdruckniveau zu einer signifikanten Zunahme der  $LF_{BP}$ -Power führt.

Ob auch eine chronische Stimulation des Renin-Angiotensin-Systems unter normotensiven Blutdruckwerten zu einer signifikanten Zunahme der  $LF_{BP}$ -Power führt, war zuvor noch nicht untersucht worden. Basierend auf obigen Ergebnissen wäre bei den zuvor beschriebenen Experimenten unter chronisch stimuliertem RAS auch unter normotensiven Blutdruckwerten mit einer signifikanten Zunahme der  $LF_{BP}$ -Power zu rechnen gewesen.

Entgegen allen theoretischen Überlegungen veränderte sich das Niveau der  $LF_{BP}$ -Power jedoch bei stimuliertem RAS und normotensiven Blutdruckwerten nicht im Vergleich zu Ausgangsbedingungen. Das RAS kann unter chronischer Aktivierung deshalb primär nicht den bisher vermuteten Einfluß bei der Generierung von niederfrequenten Oszillationen im Powerspektrum des Blutdrucks ausüben. Ein Vergleich mit der Literatur zeigt, daß hypertensive Blutdruckwerte mit einer Zunahme der Power im niederfrequenten Bereich einhergehen [3, 41, 85, 86, 87]. Der Frequenzbereich von 0.02-0.2 Hz repräsentiert daher wahrscheinlich die Auswirkungen von Blutdruckänderungen auf das Powerspektrum. Die vorliegenden Ergebnisse weisen darauf hin, daß die  $LF_{BP}$ -Power sekundär vom Niveau des arteriellen Blutdrucks abhängig ist und nicht primär durch chronische Aktivitätsänderungen im Renin-Angiotensin-System hervorgerufen wird. Ob hierbei im niederfrequenten Bereich des Powerspektrums neben dem Renin-Angiotensin-System die Einflüsse anderer regulatorischer Systeme zum Tragen kommen, läßt sich mit dieser Studie nicht beurteilen.

Weiterhin ist bei den tierexperimentellen Studien von Ponchon et al. zu berücksichtigen, daß es sich um Akutversuche gehandelt hat, bei denen die hämodynamischen Messungen nach akuter Gabe von Losartan erfolgten. Zwar wurde den Versuchstieren eine Zeit von 20 Minuten zur Adaptation an die vorherrschenden Versuchsbedingungen gewährt, dennoch lassen sich kompensatorische und das Powerspektrum beeinflussende Interaktionen des autonomen Nervensystems nicht ausschließen bzw. sicher quantifizieren. So beobachteten Ponchon et al. nach Injektion von Losartan bei beiden Versuchsgruppen ihres Experiments eine Tachykardie mit einer signifikanten Zunahme der  $MF_{BP}$ -Power. Dieses Phänomen wurde von der Arbeitsgruppe als reflektorisch ausgelöste Sympathikusaktivierung infolge der Intervention bewertet. In welchem Ausmaß das sympathische Nervensystem bei diesen Akutversuchen aktiviert und welcher Einfluß hierdurch auf das Powerspektrum ausgeübt wurde, kann weder qualitativ noch quantitativ anhand der erhobenen Daten abgeschätzt werden.

Dieser Befund der Sympathikusaktivierung nach akuter Medikamentengabe deckt sich mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen. In ihren Versuchen beobachteten sowohl Akselrod et al. [3] als auch Bertram et al. [10] unter akuter Blockade eines aktivierten RAS eine Zunahme der  $MF_{BP}$ -Power, die von beiden Gruppen unabhängig als reflektorisch ausgelöste Sympathikusaktivierung infolge einer medikamentös induzierten, akuten Vasodilatation gewertet wurde.

Bei den hier dargestellten Versuchen konnte gezeigt werden, daß ein chronisch stimuliertes Renin-Angiotensin-System einzig und allein unter hypertensiven, nicht jedoch unter normotensiven Blutdruckwerten, zu einer Zunahme der Power im Frequenzbereich zwischen 0.02-0.2 Hz führt. Folglich besteht eher ein direkter Zusammenhang zwischen der  $LF_{BP}$ -Power und der Höhe des Blutdrucks als zwischen der  $LF_{BP}$ -Power und der Aktivität des Renin-Angiotensin-Systems.

Wie den Abbildungen 3.29 und 3.30 zu entnehmen ist, bestand bei beiden mit Placebo behandelten Versuchsgruppen eine enge Korrelation zwischen Blutdruck und  $LF_{BP}$ -Power. Die Kontrolltiere aus dem Wistar-Tierstamm wiesen einen Korrelationskoeffizienten  $r^2$  von 0.44 auf. Bei der entsprechenden Behandlungsgruppe aus dem Brown-Norway-Katholiek-Stamm fiel dieser Zusammenhang mit einem Korrelationskoeffizienten  $r^2$  von 0.57 sogar noch deutlicher aus. Einschränkend ist jedoch bei diesem Tierstamm zu erwähnen, daß sich auch in der Behandlungsgruppe mit Hydralazin ein deutlicher Zusammenhang zwischen  $LF_{BP}$ -Power und Blutdruck bei einem Korrelationskoeffizienten  $r^2$  von 0.45 findet. Erklärbar könnte dieser Befund dadurch sein, daß der Blutdruck bei den kinindefizienten Brown-Norway-Tieren durch die Behandlung mit Hydralazin unter stimuliertem RAS trotz hoher Hydralazindosen nicht auf ein normotensives Niveau gesenkt werden konnte. Der Blutdruck stieg in der ersten und dritten Woche der Clipphase sogar signifikant an, so daß die enge Korrelation in dieser Behandlungsgruppe wahrscheinlich Ausdruck des hypertensiven Blutdruckniveaus ist. Bei den hämodynamisch effektiv mit Hydralazin behandelten Tieren aus dem Wistar-Stamm fehlt der Zusammenhang zwischen  $LF_{BP}$ -Power und Blutdruck. Hier berechnet sich ein Korrelationskoeffizient  $r^2$  von 0.08. Unter aktiviertem RAS und der Behandlung mit Hydralazin fand sich in dieser Versuchsgruppe weder ein Anstieg der  $LF_{BP}$ -Power noch des Blutdrucks. Folglich bestand hier keine Korrelation zwischen beiden Parametern.

Diese Ergebnisse könnten durch eine erhöhte Sensitivität der kinindefizienten Brown-Norway-Tiere gegenüber vasopressorisch wirksamen Substanzen erklärbar sein: Zu einem arteriellen Hypertonus kommt es vereinfacht gesehen als Folge eines Ungleichgewichts zwischen vasokonstriktorisches und vasodilatatorischen Einflüssen. Während das RAS u.a. durch Natrium- und Wasserretention zu einer Blutdruckerhöhung führt, vermittelt das KKS über  $B_1$ - und  $B_2$ -Rezeptoren eine Natriurese und Diurese mit Vasodilatation. So ist beispielsweise bekannt [7, 89], daß ein arterieller Hypertonus sowohl beim Menschen als auch bei der Ratte mit einer verminderten Aktivität des KKS assoziiert ist.

In einem Experiment konnten Madeddu et al. zeigen [69], daß Ratten unter chronischer Blockade des  $B_2$ -Rezeptors mittels Icatibant im Vergleich zu Kontrolltieren einen Hypertonus entwickelten, wenn sie mit intraperitonealen Angiotensin II-Infusionen in subhypertensiver Dosis (20 nmol/Tag) behandelt werden.

Ähnliche Ergebnisse lieferten Untersuchungen von Majima et al. [70]. Als kinindefizientes Modell verwendeten die Forscher Brown-Norway-Katholiek-Ratten. Bei diesen Tieren handelt es sich um einen Tierstamm, der infolge eines autosomal-rezessiv vererbten Gendefektes nicht in der Lage ist, in der Leber synthetisiertes Kininogen in das Plasma zu sezernieren. Die Folge ist ein Mangel an Kininen im Plasma. Majima et al. fanden heraus, daß diese Ratten unter hypertensiven und subhypertensiven Dosen von Angiotensin II sowie Desoxycorticosteronacetat (DOCA) eher eine Hypertonie entwickelten als normale Brown-Norway-Tiere ohne Defekt im Kininsystem. Sie konnten weiterhin zeigen, daß auch bei normalen Brown-Norway-Ratten durch Angiotensin II-Gaben in normalerweise nicht blutdruckwirksamer Dosis hypertensive Druckwerte hervorgerufen werden konnten, wenn diese Tiere entweder mit dem Kallikrein-Inhibitor Aprotinin oder dem B<sub>2</sub>-Kininrezeptorantagonisten Icatibant behandelt wurden.

Aus ihren Ergebnissen folgerten beide Forschergruppen, daß wahrscheinlich der Einfluß vasokonstriktorischer und natriumretinierender Systeme durch den Defekt im Kallikrein-Kinin-System überwiegt und somit die Entwicklung eines Hypertonus begünstigt wird.

Auch eine Forschergruppe um Prof. Unger konnte die Bedeutung von Kininen bei der akuten antihypertensiven Wirkung von ACE-Hemmern nachweisen [32]. In einer Studie induzierten die Forscher bei kinindefizienten Brown-Norway-Tieren sowie bei Brown-Norway-Hannover- und Wistar-Ratten eine renovaskuläre Hypertonie (1C-2K). Eine akute intravenöse Bolusinjektion des ACE-Hemmers Ramipril führte bei den kinindefizienten Brown-Norway-Ratten im Vergleich zu den Wistar- und Brown-Norway-Hannover-Ratten zu einem signifikant abgeschwächten Blutdruckabfall.

In dem hier beschriebenen Experiment fanden sich zwischen den Brown-Norway-Katholiek- und Wistar-Ratten Unterschiede sowohl beim Blutdruckverhalten als auch bei der zur Blutdrucksenkung erforderlichen Hydralazindosis. Letztere lag bei den kinindefizienten Tieren zum einen signifikant über der der Wistar-Ratten und reichte zum anderen nicht aus, den Blutdruck suffizient auf das Ausgangsniveau der ersten Kontrollphase zu senken. In der Behandlungsgruppe mit Hydralazin war bei den kinindefizienten Brown-Norway-Ratten mit einem Korrelationskoeffizienten  $r^2$  von 0.45 unter erhöhten Blutdruckwerten ein deutlicher Zusammenhang zwischen  $LF_{BP}$ -Power und Blutdruck erkennbar.

Vergleicht man die Ergebnisse dieses Experiments mit Untersuchungen von Pascal Ponchon [86], so kann die Bedeutung des Kallikrein-Kinin-Systems für die  $LF_{BP}$ -Power bestätigt werden. In ihrer Studie untersuchten Ponchon et al. den Einfluß des Renin-Angiotensin-Systems (RAS) und des Kallikrein-Kinin-Systems (KKS) auf die Blutdruckvariabilität bei Wistar-Ratten mit renovaskulärer Hypertonie (1C-2K). Unter renovaskulärer Hypertonie fand sich bei diesen Tieren eine signifikante Zunahme der  $LF_{BP}$ -Power im Vergleich zu den Kontrolltieren. Sowohl durch intravenöse Gabe des  $AT_1$ -Rezeptorantagonisten Losartan als auch durch eine Behandlung mit dem Bradykinin-Antagonisten HOE 140 ließ sich diese Zunahme der  $LF_{BP}$ -Power unter stimuliertem RAS signifikant abschwächen. Unter einer kombinierten Blockade des Renin-Angiotensin- und des Kallikrein-Kinin-Systems durch HOE 140 und Losartan war die  $LF_{BP}$ -Power im Vergleich zu den scheinoperierten Tieren unverändert. Aus diesen Ergebnissen folgerten Ponchon et al., daß sowohl das RAS als auch das KKS eine wichtige Rolle im niederfrequenten Bereich der Blutdruckvariabilität spielen.

In dem hier beschriebenen Experiment wurde für die  $LF_{BP}$ -Power in einer zwei-Weg ANOVA für Placebobehandlung mit dem Tierstamm als erstem Weg und der Woche des Experiments als zweitem Weg ein phasenabhängiger, hochsignifikanter Unterschied zwischen beiden Tierstämmen ( $p < 0,01$ ) festgestellt. In den bei der anschließenden ein-Weg ANOVA gewonnenen post-hoc Tests ließ sich dieser Unterschied für den Zeitraum mit stimuliertem Renin-Angiotensin-System ermitteln.

Somit könnten die unter stimuliertem RAS trotz Behandlung mit Hydralazin registrierten hypertensiven Blutdruckwerte in dieser Behandlungsgruppe Ausdruck einer unzureichenden Gegenregulationsmöglichkeit der kinindefizienten Tiere auf blutdrucksteigernde Einflüsse sein. Durch diese Überlegungen wären auch die im Vergleich zu den Wistar-Tieren signifikant höheren Hydralazindosen während dieser Versuchsphase erklärbar.

Auch in dieser Arbeit stellte sich somit heraus, daß Kinine einen signifikanten Einfluß auf die  $LF_{BP}$ -Power besitzen.

## 4.1 Doppelt-transgene Sprague-Dawley-Ratten

Um die gewonnenen Ergebnisse des Versuchs mit Nierenarterienclip und aktiviertem RAS mit einem weiteren experimentellen Tiermodell vergleichen zu können, wurden genetisch veränderte Spague-Dawley-Ratten in einem Folgeexperiment untersucht. Mit den doppelt-transgenen Tieren war es möglich, gezielt Einflüsse eines überexprimierten Renin-Angiotensin-Systems auf das Powerspektrum des Blutdrucks und der Herzfrequenz untersuchen zu können.

Die Ergebnisse der chronischen Studie konnten durch die akuten Versuche mit den doppelt-transgenen Tieren bestätigt werden. Im Gegensatz zu beiden ursprünglich für die Kreuzung verwendeten normotensiven, einfach-transgenen Tierstämmen weist der doppelt-transgene Tierstamm eine auf einer Überexprimierung von humanem Renin (hREN) und Angiotensinogen (hAOGEN) beruhende, maligne Hypertonie auf. Die Untersuchung dieser Tiere konnte zeigen, daß eine auf einer Stimulation des RAS beruhende Hypertonie mit einer signifikanten Erhöhung der  $LF_{BP}$ -Power verbunden ist.

Eine akute Blutdrucksenkung durch Infusionen von NaNP bewirkte eine Zunahme der absoluten  $LF_{BP}$ -Power sowie eine Zunahme der Power im mittel- und hochfrequenten Bereich. Unter Betrachtung des relativen Powerspektrums lag keine Änderung der relativen  $LF_{BP}$ -Power vor. Im Frequenzbereich von 0.02 bis 0.2 Hz unterschied sich die relative Power der transgenen Ratten unter basalen Bedingungen nicht von der unter Infusion mit NaNP und der des Wildtyps.

Die Zunahme der Power im gesamten Spektralbereich war wahrscheinlich zu einem großen Anteil auf die akute Gabe von NaNP mit Aktivierung diverser gegenregulatorischer Systeme, wie z.B. dem sympathischen Nervensystem, zurückzuführen.

Dieses Akutexperiment unterstreicht somit die Bedeutung und Vorteile chronisch angelegter Experimente, bei denen akute gegenregulatorische Einflüsse auf ein Minimum reduziert werden.



## 4.2 Methodenkritik

Um die bei der Studie von P. Ponchon et al. noch unbeantworteten Fragen klären zu können, wurde ein Studienprotokoll entwickelt, das eine Beantwortung der noch offenen Fragen ermöglichen sollte. Beim Design dieser Studie wurde dabei besonderes Augenmerk auf folgende Punkte bzw. Aspekte gelegt:

- Drucksenkung bei renovaskulärer Hypertonie durch ein direkt vasodilatatorisch wirksames Pharmakon ohne direkte Interferenz mit dem RAS
- Blutdruckadaptierte Dosierung von Hydralazin unter stimuliertem RAS, um den Blutdruck auf das Niveau aus der vorangegangenen ersten Kontrollphase senken zu können
- Messung der Reninaktivität zur Objektivierung der durch die Implantation des Nierenarterienclips ausgelösten Aktivierung des RAS
- Messung der Aktivität und Sensitivität des Barorezeptor-Reflexes
- Blutdruckmessung mittels Telemetrie, um Störeinflüsse bei der Blutdruckmessung möglichst gering zu halten
- 24-Stunden-Blutdruckmessungen, um die zirkadiane Rhythmik unter normo- und hypertensiven Druckwerten untersuchen zu können
- Untersuchungen zum Longitudinal- und Transversalverlauf des Blutdrucks und der Herzfrequenz
- Chronische Medikamentengabe und keine Applikation über Akutversuche
- Verwendung des Brown-Norway-Katholik-Tierstammes als zweites Tiermodell, um Einflüsse des Kallikrein-Kinin-Systems auf das Powerspektrum untersuchen zu können
- Verwendung von doppelt-transgenen Tieren mit überexprimiertem Renin-Angiotensin-System, um den Einfluß dieses Hormonsystems auf das Powerspektrum in einem weiteren Tiermodell untersuchen zu können

Die wichtigste Fragestellung, die durch diese Studie geklärt werden sollte, war, welche Auswirkungen ein aktiviertes RAS auf das Powerspektrum des Blutdrucks unter normotensiven Blutdruckwerten ausübt. Als Modell für eine Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems diente hierbei die renovaskuläre „1-Clip-2-Kidney“-Hypertonie, wie sie erstmals 1934 von Harry Goldblatt beschrieben worden war [43]. Diese sog. „Goldblatt-Hypertonie“ zählt mittlerweile zu den etablierten experimentellen Methoden zur Induktion eines renalen Bluthochdrucks und fand in der Vergangenheit mehrfach Anwendung [6, 12, 38, 61, 85, 86, 91, 115].

Um den Blutdruck unter aktiviertem RAS auf ein normotensives Druckniveau zu senken, wurde ein Medikament verwendet, das im Gegensatz zu allen vorherigen Studien bei der Drucksenkung bei renovaskulärer Hypertonie nicht direkt in dieses Hormonsystem eingreift.

Diese Anforderungen wurden durch das direkt vasodilatatorisch wirkende Antihypertensivum Hydralazin erfüllt. Dieses Medikament ermöglichte es somit, die Auswirkungen eines stimulierten RAS auf das Powerspektrum unter normotensiven Blutdruckwerten untersuchen zu können. Versuchstiere der entsprechenden Behandlungsgruppe erhielten täglich Hydralazindosen, die sich nach der Höhe des Blutdrucks bei der letzten Registrierung richteten. Intention dieser täglichen Anpassung der Hydralazindosis an die aktuellen Druckwerte war es, den Blutdruck in dieser Phase gezielt auf das Druckniveau der vorangegangenen Kontrollphase zu senken.

Um Effekte und Einflüsse eines Akutversuches zu vermeiden, erfolgte die Hydralazinapplikation in dieser Arbeit durch tägliche orale Applikationen via Schlundsonde. Hierdurch ließ sich ein konstanter Wirkspiegel mit permanenter Drucksenkung über den gesamten Zeitraum mit aktiviertem Renin-Angiotensin-System erreichen. Das Augenmerk dieser Untersuchungen richtete sich somit auf die physiologischen, langfristig durch eine Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems ausgelösten Regulationsvorgänge und weniger auf akute Prozesse nach vorangegangener medikamentöser Intervention. Zwischen täglicher Medikamentenapplikation und der Blutdruckregistrierung wurde 2-3 Stunden gewartet, um hierdurch mögliche applikationsbedingte akute Effekte zu minimieren. Auch durch Langzeitversuche an chronisch behandelten Tieren können akute Effekte durch gegenregulatorische Systeme zwar nicht vollständig ausgeschlossen werden, eine Beeinflussung des Powerspektrums durch die akute Medikamentenapplikation wird aber durch die chronische Gabe der Medikamente auf ein Minimum reduziert. Die unter chronischem Studiendesign in den Signalen vorkommenden BP- und HF-Schwankungen sind mit höherer Sicherheit auf Langzeiteffekte der Medikamentenwirkung zurückzuführen und weniger auf das Powerspektrum beeinflussende Faktoren, die durch eine akute Medikamentengabe ausgelöst werden.

Bei der Gabe von Hydralazin als Monotherapie war jedoch zu bedenken, daß es hierunter – zumindest im humanmedizinischen Bereich – zu einer ausgeprägten, über den Barorezeptor-Reflex vermittelten, Gegenregulation mit steigendem Sympathikotonus und einer Zunahme der Herzfrequenz und des Schlagvolumens kommen kann [37].

Vorangegangene Untersuchungen von Marie-Laure Grichois aus der Arbeitsgruppe um Jean-Luc Elghozi hatten jedoch zuvor gezeigt, daß eine chronische Gabe von Hydralazin keine signifikanten Auswirkungen auf das Powerspektrum des arteriellen Blutdrucks besitzt [46]. In ihren Experimenten untersuchte sie anhand der Powerspektralanalyse akute und chronische Effekte sowohl des ACE-Hemmers Enalapril als auch des Vasodilatators Hydralazin auf die Variabilität von Blutdruck und Herzfrequenz an normotensiven Wistar-Ratten. Sie fand heraus, daß sowohl Enalapril als auch Hydralazin unter akuter Gabe zu einem signifikanten Anstieg der Blutdruck-Power im Frequenzbereich um 0.4 Hz führen. Eine chronische Behandlung mit Hydralazin war – im Gegensatz zu der mit Enalapril – nicht mit signifikanten Veränderungen im Powerspektrum verbunden. Eine chronische Blockade des RAS führte hier zu einem signifikanten Abfall der BP-Power im Frequenzbereich zwischen 0.2 und 0.6 Hz, der vermutlich auf eine sympathoinhibitorische Wirkung zurückzuführen war.

In einem Folgeexperiment [88] mit Hydralazin in höherer, hypotensiv wirksamer Dosierung kam es bei ähnlichem Studiendesign unter akuter Gabe von Hydralazin zu einem deutlichen Blutdruckabfall mit Auftreten einer Reflextachykardie. Signifikante Änderungen im Powerspektrum des Blutdrucks konnten unter Hydralazin in einer Konzentration von 40 mg / 100 ml nicht registriert werden. In dieser Dosierung fand sich ebenfalls keine Änderung der Standardabweichung von kardiovaskulären Parametern, die nach Barrès als statistischer Index für die sogenannte „Overall-Variabilität“ anzusehen ist [4].

Weiterhin wurde in dieser Studie die Aktivität des sympathischen Nervensystems indirekt durch Messung des Blutdrucks und der Herzfrequenz nach sequentieller pharmakologischer Blockade abgeschätzt. Unter hohen Hydralazindosen fand sich eine signifikante reflektorische Aktivierung des sympathischen Nervensystems. Trotz des aktivierten sympathischen Nervensystems kam es bei unveränderter Blutdruckvariabilität zu keinem Anstieg der  $MF_{BP}$ -Power. Die Autoren führten dieses Phänomen auf den deutlichen, medikamentös induzierten Blutdruckabfall zurück, der wahrscheinlich in der Lage war, die durch Aktivierung des Sympathikus bedingten Oszillationen im mittelfrequenten Bereich abzupuffern.

Als Schlußfolgerung zogen sie hieraus, daß der mittelfrequente Bereich der Blutdruckvariabilität nur dann als Marker der Sympathikusaktivität angesehen werden darf, wenn die Höhe des Blutdrucks unverändert bleibt.

Daten über die zur Blutdrucknormalisierung bei renovaskulärer, auf einer Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems beruhenden Hypertonie benötigte tägliche Hydralazindosis existieren bisher nicht. In einer Studie verwendeten Ponchon et al. bei normotensiven Wistar-Ratten zwei unterschiedliche intraarteriell applizierte Konzentrationen an Hydralazin [88]. (1) Eine niedrigdosierte, subhypotensive Dosis von 0.15 mg Hydralazin pro Kilogramm Körpergewicht und (2) eine hochdosierte, hypotensiv wirksame Hydralazindosis in einer Konzentration von 2 mg Hydralazin pro Kilogramm Körpergewicht.

In einer weiteren Studie beschäftigte sich die gleiche Forschergruppe mit den Effekten von Hydralazin auf die Blutdruck- und Herzfrequenzvariabilität bei normotensiven Versuchstieren [46]. In diesem Versuch wurden die Auswirkungen einer akuten und chronischen Gabe dieses Vasodilatators auf das Powerspektrum untersucht. Um das Zusammenspiel von Renin-Angiotensin-System und sympathischem Nervensystem beurteilen zu können, wurden akute und chronische Effekte von Hydralazin und Enalapril, einem ACE-Hemmer, untersucht. Die Versuchstiere der Hydralazingruppe erhielten eine Trinkwasserbehandlung mit 40 mg Hydralazin pro 100 ml Trinkflüssigkeit, wobei die Trinkmenge und somit die aufgenommene Menge an Hydralazin täglich bestimmt wurde. Die durchschnittliche tägliche Trinkmenge lag in dieser Behandlungsgruppe bei  $23 \pm 1$  ml entsprechend einer aufgenommenen Hydralazindosis von 9.2 mg Hydralazin pro Tag. Ein Einfluß auf die täglich aufgenommene Hydralazindosis konnte bei diesem Studiendesign nicht genommen werden. Die tägliche Trinkmenge in der Hydralazingruppe war in diesem Experiment nur knapp halb so groß wie die in der Placebogruppe ( $38 \pm 1$  ml pro Tag). Tiere aus der Enalaprilgruppe wiesen eine wahrscheinlich auf einer vermehrten renalen Natrium- und Wasserausscheidung beruhende tägliche Trinkmenge von  $49 \pm 3$  ml pro Tag auf.

In der dieser Arbeit zugrundeliegenden Versuchsreihe wurde Hydralazin erstmals bei renovaskulärer Hypertonie und Powerspektralanalyse zur chronischen Blutdrucksenkung eingesetzt. Durch eine blutdruckabhängige Ermittlung der täglichen Hydralazindosis und die Hydralazinapplikation via Gavage ließ sich die mediakmentöse Drucksenkung bestmöglich steuern. Die in der oben aufgeführten Literatur unter normotensivem Blutdruckniveau verwendete Hydralazindosis reichte in dieser Studie mit renovaskulärer Hypertonie nicht aus, den Blutdruck suffizient auf das Ausgangsniveau der ersten Kontrollphase zu senken. Bei den Versuchstieren des Wistar-Tierstammes wurde die maximal zur Drucknormalisierung notwendige Hydralazindosis von ca. 60 mg Hydralazin pro Tag während der zweiten Woche der Clipphase benötigt. Unter stimuliertem Renin-Angiotensin System waren in dieser Behandlungsgruppe über die drei Wochen gemittelt täglich 40 mg Hydralazin pro Kilogramm Körpergewicht erforderlich, um den Blutdruck suffizient auf das Ausgangsniveau zu senken.

Im Gegensatz hierzu betrug bei den kinindefizienten Brown-Norway-Tieren die zur Blutdrucksenkung auf das Ausgangsniveau minimal benötigte Hydralazindosis in der ersten Woche der Clipphase bereits 60 mg Hydralazin pro Kilogramm Körpergewicht. Im Laufe der drei Wochen unter stimuliertem RAS wurden in diesem Tierstamm zur Blutdrucknormalisierung kontinuierlich steigende Dosen an Hydralazin benötigt. In der dritten Woche reichten sogar täglich knapp 120 mg Hydralazin pro Tag nicht aus, um den Blutdruck suffizient auf das Ausgangsniveau zu senken. Die durchschnittlich zur Blutdrucksenkung erforderliche Hydralazindosis während der Clipphase war mit täglich ca. 80 mg Hydralazin pro Kilogramm etwa doppelt so groß wie die in der entsprechenden Behandlungsgruppe aus dem Wistar-Tierstamm.

Erklärbar könnte dieses Phänomen von zunehmend steigenden Dosen an Hydralazin dadurch sein, daß die vermehrte Bildung von Angiotensin II als Folge der Nierenclipimplantation und Reninfreisetzung unter einer antihypertensiven Therapie mit Hydralazin bei den Brown-Norway-Katholiek-Tieren nicht in der Lage war, den Blutdruckabfall in der Niere zu korrigieren. Hierdurch ließen sich die steigenden Dosen an Hydralazin im Sinne eines Circulus vitiosus der Reninausschüttung erklären. Bei den Brown-Norway-Katholiek-Tieren könnte der Defekt im Kininsystem hierbei zu einer verstärkten Ansprechbarkeit des Gefäßsystems auf vasopressorische Substanzen geführt haben. So hatten unterschiedliche Forschergruppen zeigen können [32, 69, 70], daß eine Kinindefizienz zu einer erhöhten Ansprechbarkeit gegenüber blutdrucksteigernden Einflüssen führt. Bei diesem Tierstamm könnte somit das Gleichgewicht zwischen vasopressorischen und vasodilatatorischen Systemen durch den Defekt im Kininsystem hin zu den blutdrucksteigernden Einflüssen verschoben sein.

Um die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems quantitativ nachweisen zu können, erfolgten am Ende jeder der drei Experimentphasen Blutentnahmen zur Bestimmung der plasmatischen Reninaktivität. In beiden Versuchsgruppen des Wistar-Tierstammes war während der Clipphase eine signifikant erhöhte Reninaktivität im Vergleich zur ersten Kontrollphase meßbar. Kritisch anzumerken hierbei ist, daß die Aussagekraft dieser Aktivitätsmessungen aufgrund von hämolytischen oder fehlenden Proben eingeschränkt und eine statistische Auswertung nur bedingt verwertbar war. Trotzdem ließ sich bei den Wistar-Tieren eine Zunahme der Reninaktivität unter stimuliertem RAS nachweisen, so daß eine Aktivierung des RAS anhand der erhobenen Werte angenommen werden kann.

Um die Sensitivität des Barorezeptor-Reflexes (BRR) beurteilen zu können, erfolgte für jede Einzelmessung offline eine Bestimmung von „up“- und „down“-Sequenzen. Anhand der Steigung der linearen Beziehung zwischen Blutdruck und RR-Interval wurde die Sensitivität des Reflexes beurteilt. Diese Methode zur Beurteilung des arteriellen Barorezeptor-Reflexes wurde erstmals 1985 von G. Bertinieri angewendet und publiziert [8]. Sie beruht auf spontan auftretenden, physiologischen Blutdruck- und Herzfrequenzänderungen, bei denen der Blutdruck in mindestens drei aufeinanderfolgenden Herzschlägen progredient ansteigt während sich der Zeitraum zwischen den Schlägen vergrößert („up“-Sequenzen) oder der Blutdruck sukzessive fällt während sich das Intervall zwischen zwei Herzschlägen verkürzt („down“-Sequenzen).

Folgearbeiten nach diesem Pilotexperiment konnten zeigen, daß spontan auftretende Blutdruckänderungen zur Abschätzung und Beurteilung des Barorezeptor-Herzfrequenz-Reflexes geeignet sind und validierten damit diese Methode [9, 27, 60].

Als Maß für die Aktivität des BRR diente in dieser Studie die Steigung der Regressionsgeraden als Ausdruck der RR-Intervalländerungen abhängig vom Blutdruck (ms/mmHg).

Untersuchungen zu den Effekten steigender zirkulierender Konzentrationen von Angiotensin II auf die Barorezeptor-Reflex vermittelte Kontrolle der Herzfrequenz konnten zeigen, daß die Regulation der Herzfrequenz durch den BRR unter steigenden Konzentrationen von Angiotensin II hin zu den hiermit einhergehenden höheren Blutdruckwerten verschoben wird [14, 53, 67, 74, 77]. Angiotensin II schwächt hierbei unter hypertensiven Druckwerten die Sensitivität des BRR durch Angriff im zentralen Nervensystem ab.

In dieser Arbeit fand sich in der Placebo-Behandlungsgruppe des Wistar-Tierstammes unter hypertensiven Blutdruckwerten und signifikant verstärkter Blutdruckvariabilität eine quantitative Zunahme von „up“- und „down“-Sequenzen. Die Sensitivität des Barorezeptor-Reflexes blieb jedoch unter den erhöhten Blutdruckwerten unverändert. Bei der entsprechenden Behandlungsgruppe aus dem Brown-Norway-Tierstamm kam es unter Bedingungen einer renovaskulären Hypertonie und verstärkter Blutdruckvariabilität zu keiner vermehrten Aktivität des Barorezeptor-Reflexes. Die Sensitivität des BRR blieb unverändert.

Die Ergebnisse der oben aufgeführten Studien konnten durch diese Arbeit somit nicht bestätigt werden. Unter Bedingungen einer renovaskulären Hypertonie mit signifikant erhöhter Blutdruckvariabilität fand sich in dieser Arbeit eine Zunahme von spontan auftretenden „up“- und „down“-Sequenzen. Die Sensitivität des BRR blieb jedoch gemessen an seiner Steigung unverändert.

Eine weitere wichtige Stütze dieser Arbeit lag in der Technik der Blutdruckmessung selbst. Um für die Tiere störende und sie zudem in ihrer Bewegungsfreiheit einengende Katheter bei der Blutdruckmessung zu vermeiden, erfolgte die Blutdruckmessung in dieser Arbeit über chronisch implantierte Telemetriesender. Allen Versuchstieren wurde nach der hierfür erforderlichen operativen Implantation des Telemetriesenders in die Aorta abdominalis eine Woche zur Erholung gewährt, bevor die ersten Blutdruckregistrierungen erfolgten. Vor jeder Messung wurde der Sender mit Hilfe eines Magneten angeschaltet. Hiernach wurden die Tiere mitsamt ihren Käfigen auf die Empfängerplatten gestellt. Die Messungen erfolgten nach ca. halbstündiger Adaptationszeit. Mit der Aufzeichnung der Blutdrucksignale wurde so lange gewartet, bis sich die Versuchstiere in ruhenden Zustand befanden und keine Bewegungsartefakte in den registrierten BP-Signalen zu finden waren.

Um Aufschluß über den zirkadianen Verlauf des Blutdrucks und der Herzfrequenz zu gewinnen, wurde am Ende jeder der drei experimentellen Phasen eine 24-Stunden-Blutdruckmessung durchgeführt. Somit ließ sich das Blutdruckverhalten auf das Vorliegen einer zirkadianen Rhythmik unter normo- und hypertensiven Bedingungen beurteilen.

Bei beiden Kontrollgruppen wurde während aller drei Phasen des Experiments eine zirkadiane Rhythmik mit einem Blutdruckabfall während der Tageszeiten (06:00 Uhr bis 18:00 Uhr) gefunden. Die hierbei in der Literatur angegebenen Unterschiede von circa 6 mmHg zwischen Nacht- und Tageszeitraum [90] konnten in diesem Experiment bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Auch beide Versuchsgruppen mit Hydralazin wiesen im Vergleich zur vorangegangenen Phase keine signifikante Änderung in der Tag/Nacht-Rhythmik während der Clipphase auf. Eine zirkadiane Rhythmik fand sich auch unter erneuten Kontrollbedingungen (Daten nicht gezeigt). Somit lag bei allen Versuchsgruppen während der drei Protokollphasen eine zirkadiane Rhythmik vor.

Vorangegangene Untersuchungen von Ponchon aus der Arbeitsgruppe Elghozi hatten eine Beeinflussung des Powerspektrums durch das Kallikrein-Kinin-System abhängig vom Blutdruck vermuten lassen [86]. Die Mitarbeiter dieser Arbeitsgruppe fanden heraus, daß Infusionen von Bradykinin je nach erzielter Drucksenkung den nieder- und mittelfrequenten Bereich des Powerspektrums verändern konnten.

Während diese Frequenzbereiche der Blutdruckvariabilität unter Bradykinin in hypotensiver Dosierung und Blutdruckabfall unverändert blieben, fand sich unter Bradykinin in subhypotensiver Dosierung und gleichbleibendem Blutdruck ein signifikanter Anstieg der  $MF_{BP}$ - und  $LF_{BP}$ -Power. Da diese Veränderungen stärker ausfielen als unter vergleichbaren subhypotensiven Dosen mit Hydralazin, vermuteten die Forscher für das Bradykinin einen zusätzlichen, von der Vasodilatation unabhängigen, Einfluß auf das Powerspektrum.

Um den Einfluß des Kallikrein-Kinin-Systems bei den vorliegenden Experimenten untersuchen zu können, wurde mit den Brown-Norway-Katholiek-Ratten ein zweiter Tierstamm verwendet, der durch einen Defekt im Kallikrein-Kinin-System charakterisiert ist. Aufgrund einer Punktmutation in der gemeinsamen schweren Kette beider Kininogene von Alanin<sup>163</sup> zu Threonin sind diese Tiere nicht in der Lage, in der Leber synthetisiertes Kininogen in die Blutbahn zu sezernieren [54, 62]. Die hieraus resultierende Hypertonie nach vermehrter Salzaufnahme beruht auf einer verminderten renalen Natrium-Ausscheidung im Vergleich zu Brown-Norway-Tieren ohne diese Mutation. Unter „normaler“ Salzaufnahme unterscheiden sich diese Tiere in ihrem Blutdruckverhalten nicht von den Kontrolltieren [62, 71].

Die hier dargestellten Ergebnisse konnten bestätigen, daß Kinine einen signifikanten Einfluß auf die  $LF_{BP}$ -Power besitzen. Unter stimuliertem RAS wurden bei den kinindefizienten Tieren zudem signifikant höhere Hydralazindosen benötigt, um eine Blutdrucksenkung zu erreichen.

Zusammenfassend konnten wir durch unsere Untersuchungen zeigen, daß eine Zunahme der  $LF_{BP}$ -Power unter experimentellen Bedingungen einer Goldblatt-Hypertonie nicht primär durch eine Aktivierung des RAS bedingt ist, sondern vielmehr eine Folge der erhöhten Blutdruckwerte im Rahmen der renovaskulären Hypertonie ist. Die Mechanismen, die bei einer Goldblatt-Hypertonie zu einer Erhöhung der Blutdruckpower im niederfrequenten Bereich führen, lassen sich mit den hier aufgeführten Untersuchungen nicht ermitteln und bleiben spekulativ. Eine mögliche Erklärung für die vermehrten Oszillationen im LF-Bereich unter hypertensiven Blutdruckwerten könnte sich auf folgende Überlegungen stützen: Unter normotensiven Bedingungen befinden sich blutdrucksteigernde und blutdrucksenkende Regulationssysteme im Gleichgewicht. Im Rahmen einer Hypertonie überwiegen die Systeme, die den Blutdruck erhöhen. Gegenregulatorisch wirksame, blutdrucksenkende Mechanismen sind nicht in der Lage, die blutdrucksteigernden Einflüsse auszugleichen. Als Folge entwickelt sich ein Hypertonus. Mit anderen Worten ausgedrückt vermag es eine vermehrte Aktivität blutdrucksenkender Systeme nicht, die blutdrucksteigernden Mechanismen zu kompensieren. Die Zunahme der  $LF_{BP}$ -Power unter renovaskulärer Hypertonie könnte somit Ausdruck einer vermehrten Aktivität von unterschiedlichen, blutdruckregulierenden Systemen sein. So ist beispielsweise bekannt, daß Stickstoffmonoxid [31, 59], Katecholamine [118] und natriuretische Peptide [24] Blutdruck- und Herzfrequenzschwankungen im LF-Bereich hervorrufen. Die größere Blutdruckvariabilität im niederfrequenten Bereich könnte somit das Zusammenspiel dieser Systeme bei der Blutdruckregulation widerspiegeln. Weitergehende Untersuchungen werden erforderlich sein, um diese Zusammenhänge experimentell abzuklären.



# Kapitel 5

## Zusammenfassung

Schwankungen des arteriellen Blutdrucks (BP) im niederfrequenten Bereich (LF, 0.02-0.2 Hz) sind möglicherweise Ausdruck von endokrinen Regulationssystemen bei der Aufrechterhaltung der kardiovaskulären Homöostase, wie beispielsweise des Renin-Angiotensin-Systems (RAS). Bei Untersuchungen an Ratten mit sogenannter „one-clip, two-kidney“ (1C-2K) Goldblatt Hypertonie wurde ein Anstieg der LF Komponente des BP-Powerspektrums unter aktiviertem RAS gefunden. Trotz der bisherigen Untersuchungen blieb jedoch die Frage ungeklärt, ob dieser Anstieg der  $LF_{BP}$ -Power auf einer Stimulation des RAS beruht, oder durch die Blutdruckerhöhung selbst bedingt ist. Aus diesem Grund wurden die Auswirkungen eines stimulierten RAS auf BP-Oszillationen im LF-Bereich in dieser Studie untersucht, während ein Blutdruckanstieg pharmakologisch verhindert wurde.

Zweiundzwanzig normotensive Wistar- und siebzehn normotensive Brown-Norway-Katholiek-Ratten wurden aus diesem Grunde chronisch mit einem Telemetriesender instrumentiert. Es erfolgten Blutentnahmen zur Reninaktivitätsbestimmung, der BP wurde jeden zweiten Tag telemetrisch aufgezeichnet. Nach drei Wochen wurden die Tiere in zwei Behandlungsgruppen aufgeteilt. Entweder wurden die Tiere einer Behandlung mit Placebo zugewiesen (n=14 bei den Wistar-Ratten und n=8 bei den Brown-Norway-Katholiek-Ratten), oder sie erhielten eine Behandlung mit Hydralazin (n=8 bei den Wistar-Ratten und n=9 bei den Brown-Norway-Katholiek-Ratten, 40-120 mg/kg/Tag). Ein Silberclip (innerer Durchmesser von 200  $\mu$ m) wurde auf die linke Nierenarterie plaziert, eine erneute Blutentnahme erfolgte und der BP wurde für weitere drei Wochen gemessen. Hiernach wurde die Behandlung beendet, der Clip von der Nierenarterie entfernt und eine letzte Blutabnahme erfolgte. Abschließende Blutdruck-Registrierungen wurden über einen Zeitraum von drei Wochen durchgeführt. Die Power im LF-Bereich wurde aus den aufgezeichneten Blutdrucksignalen berechnet.

Nach Implantation eines Nierenclips stieg der BP bei den mit Placebo behandelten Tieren signifikant an ( $+37 \pm 5.7$  mmHg bei den Wistar-Ratten und  $+50 \pm 7.4$  mmHg bei den Brown-Norway-Katholiek-Ratten,  $p < 0,05$ ) und kehrte wieder auf das Ausgangsniveau zurück, nachdem der Nierenarterienclip explantiert worden war. Bei den Wistar-Ratten, die unter stimuliertem RAS mit Hydralazin behandelt worden waren, konnte ein Blutdruckanstieg pharmakologisch verhindert werden. Im Gegensatz hierzu konnte dieser in der entsprechenden Behandlungsgruppe aus dem Brown-Norway-Katholiek-Tierstamm in der ersten und letzten Woche dieser Phase selbst durch eine steigende Konzentrationen dieses Antihypertensivums nicht verhindert werden. Die Goldblatt Hypertonie verursachte einen Anstieg der  $LF_{BP}$ -Power bei den mit Placebo behandelten Tieren ( $+2.2 \pm 0.7$  mmHg<sup>2</sup> bei den Wistar Ratten und  $+3.8 \pm 1.0$  mmHg<sup>2</sup> bei den Brown-Norway-Katholiek-Ratten), der nach der Clipexplantation und Terminierung der RAS-Aktivierung vollständig reversibel war. Im Gegensatz hierzu änderte sich die  $LF_{BP}$ -Power bei den mit Hydralazin behandelten Tieren unter stimuliertem RAS nicht ( $-0.3 \pm 0.3$  mmHg<sup>2</sup> bei den Wistar-Ratten,  $+0.7 \pm 0.5$  mmHg<sup>2</sup> bei den Brown-Norway-Katholiek-Ratten). In der Kontrollgruppe des Wistar-Stammes fand sich mit einem Korrelationskoeffizienten  $r^2=0.44$  eine enge Korrelation zwischen  $LF_{BP}$ -Power und Blutdruck. Dieser Zusammenhang zwischen beiden Parametern fehlte in der Behandlungsgruppe mit Hydralazin ( $r^2=0.08$ ). Bei den Brown-Norway-Katholiek-Ratten war dieser Zusammenhang unter signifikant erhöhten Blutdruckwerten sowohl in der Kontrollgruppe ( $r^2=0.57$ ) als auch in der Behandlungsgruppe mit Hydralazin ( $r^2=0.45$ ) nachweisbar. Da kein Zuwachs der  $LF_{BP}$ -Power bei den Tieren mit stimuliertem RAS zu verzeichnen war, wenn der BP pharmakologisch auf normotensivem Niveau gehalten wurde, ist der Anstieg der  $LF_{BP}$ -Power im Rahmen einer „one-clip, two-kidney“ Goldblatt Hypertonie somit am ehesten auf die erhöhten BP Werte zurückzuführen und nicht auf eine Aktivierung des RAS.

### **Schlagwörter:**

Renin-Angiotensin-System, Goldblatt-Hypertonie, Telemetrie, chronischer Versuch, Powerspektralanalyse,  $LF_{BP}$ -Power

## Abstract

Low frequency (LF, 0.02-0.2 Hz) blood pressure (BP) fluctuations may result from cardiovascular regulation by endocrine systems such as the renin-angiotensin system (RAS). Studies employing one-clip, two-kidney (1C-2K) Goldblatt hypertension in rats demonstrated an increase in the LF component of the BP power spectrum. However it remains controversial, whether this increase in  $LF_{BP}$ -Power is due to the stimulation of the RAS or to the elevation in BP itself. Therefore, we investigated the effect of RAS stimulation on  $LF_{BP}$  fluctuation while the increase in BP was prevented pharmacologically.

Twenty-two normotensive Wistar and seventeen Brown-Norway Katholiek rats were chronically instrumented with telemetric BP sensors, blood samples for measurement of the renin activity were taken and BP was monitored every other day. Three weeks later, rats were subjected to oral treatment with either placebo (n=14 in the Wistar rats and n=8 in the Brown-Norway Katholiek rats) or hydralazine (n=8 in the Wistar rats and n=9 in the Brown-Norway Katholiek rats, 40-120 mg/kg/day). A stainless steel clip (inner diameter 200  $\mu$ m) was placed on the left renal artery, again blood samples were taken and BP was recorded for another three weeks. Finally, treatment was discontinued, the clip was removed from the renal artery, a last blood sample was taken and BP was monitored for a final period of three weeks. LF spectral power was calculated off-line from the recorded BP signal.

After renal artery clipping BP significantly increased in placebo-treated rats ( $+37 \pm 5.7$  mmHg in the Wistar rats,  $+50 \pm 7.4$  mmHg in the Brown-Norway Katholiek rats,  $p < 0.05$ ) and returned to baseline values after the renal artery clip was removed. In Wistar rats treated with hydralazine BP did not increase by renal artery clipping. In contrast in the Brown-Norway Katholiek rats treated with hydralazine increasing concentrations of this antihypertensive agent were not sufficient to avoid an increase in BP in the first and last week of this period. Goldblatt hypertension induced an increase in  $LF_{BP}$ -Power in placebo-treated rats ( $+2.2 \pm 0.7$  mmHg<sup>2</sup> in the Wistar rats,  $+3.8 \pm 1.0$  mmHg<sup>2</sup> in the Brown-Norway Katholiek rats,  $p < 0.05$ ) that was reversible by unclipping of the renal artery. In contrast,  $LF_{BP}$ -Power in hydralazine-treated rats was not changed by renal artery clipping ( $-0.3 \pm 0.3$  mmHg<sup>2</sup> in the Wistar rats,  $+0.7 \pm 0.5$  mmHg<sup>2</sup> in the Brown-Norway Katholiek rats).

In the placebo-treated Wistar rats a strong correlation between  $LF_{BP}$ -Power and BP was found with a correlation coefficient of  $r^2=0.44$ . This correlation between these two parameters was absent in the group treated with hydralazine ( $r^2=0.08$ ). In the kinin-deficient Brown-Norway rats a strong correlation between  $LF_{BP}$ -Power and BP was found in placebo and hydralazine-treated rats.

In conclusion the increase in  $LF_{BP}$ -Power associated with one-clip, two-kidney Goldblatt hypertension is due to the increase in BP rather than to a stimulation of the RAS, since the  $LF_{BP}$ -Power did not increase in rats with a stimulated RAS, if the increase in BP was prevented by an antihypertensive treatment.

**Keywords:**

Renin-Angiotensin System, Goldblatt hypertension, Telemetry, chronic experiment, power spectral analysis,  $LF_{BP}$ -Power

Betreuer: Prof. Dr. med. P. B. Persson

# Literaturverzeichnis

- [1] S. Akselrod, S. Eliash, O. Oz, and S. Cohen. Hemodynamic regulation in SHR: investigation by spectral analysis. *Am. J. Physiol.*, 22:H176–H183, 1987.
- [2] S. Akselrod, D. Gordon, J. B. Madwed, N. C. Snidman, D. C. Shannon, and R. J. Cohen. Hemodynamic regulation: investigation by spectral analysis. *Am. J. Physiol.*, 249:H867–H875, 1985.
- [3] S. Akselrod, D. Gordon, F. A. Ubel, D. C. Shannon, A. C. Berger, and R. J. Cohen. Power spectrum analysis of heart rate fluctuation: a quantitative probe of beat-to-beat cardiovascular control. *Science*, 213:220–222, 1981.
- [4] C. Barrès, C. Cerutti, C. Paultre, and J. Sassard. Antihypertensive effects of S9490-3, a new converting enzyme inhibitor, in the conscious spontaneously hypertensive rat. *Clin. Sci.*, 70:167–175, 1986.
- [5] F. Bartter, A. Caspe, C. Delea, and J. Slater. On the role of the kidney in control of adrenal steroid production. *Metabol. Clin. Exp.*, 10:1006–1020, 1961.
- [6] M. A. Bennett and H. Thurston. Effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors on resistance artery structure and endothelium-dependent relaxation in two-kidney, one-clip goldblatt hypertensive and sham-operated rats. *Clin. Sci. (Lond)*, 90(1):21–29, 1996.
- [7] T. D. Berry, S. J. Hasstedt, S. C. Hunt, L. L. Wu, J. B. Smith, K. O. Ash, H. Kuida, and R. R. Williams. A gene for high kallikrein may protect against hypertension in Utah kinreds. *Hypertension*, 13:3–8, 1989.
- [8] G. Bertinieri, M. Di Rienzo, A. Cavallazzi, A. U. Ferrari, A. Pedotti, and G. Mancia. A new approach to analysis of the arterial baroreflex. *J. Hypertens.*, 3(Suppl. 3):S79–S81, 1985.

- [9] G. Bertinieri, M. Di Rienzo, A. Cavallazzi, A. U. Ferrari, A. Pedotti, and G. Mancia. Evaluation of baroreceptor reflex by blood pressure monitoring in unanesthetized cats. *Am. J. Physiol.*, 254:H377–H383, 1988.
- [10] D. Bertram, C. Barrès, Y. Cheng, and C. Julien. Norepinephrine reuptake, baroreflex dynamics, and arterial pressure variability in rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 279(4):R1257–R1267, 2000.
- [11] D. Bertram, C. Barrès, G. Cuisinaud, and C. Julien. The arterial baroreceptor reflex of the rat exhibits positive feedback properties at the frequency of Mayer waves. *J. Physiol. (Lond)*, 513:251–261, 1998.
- [12] L. G. Bianciotti and A. J. de Bold. Modulation of cardiac natriuretic peptide gene expression following endothelin type a receptor blockade in renovascular hypertension. *Cardiovasc. Res.*, 49(4):808–816, 2001.
- [13] P. Biron, W. Koiw, W. Nowaczynski, J. Brouillet, and J. Genest. The effects of intravenous infusion of valine-5-angiotensin II and other pressor agents on urinary electrolyte and corticosteroids, including aldosterone. *J. Clin. Invest.*, 40:338–347, 1961.
- [14] V. S. Bishop, M. Ryuzaki, Y. Cai, Y. Nishida, and B. F. Cox. Angiotensin II-dependent hypertension and the arterial baroreflex. *Clin. and Exper. Hypertension*, 17:29–38, 1995. [Review].
- [15] J. Blanc, G. Lambert, and J.-L. Elghozi. Endogenous renin and related short-term blood pressure variability in the conscious rat. *Eur. J. Pharmacol.*, 394(2-3):311–320, 2000.
- [16] J. Bohlender, A. Fukamizu, A. Lippoldt, T. Nomura, R. Dietz, J. Ménard, K. Murakami, F. C. Luft, and D. Ganten. High human renin hypertension in transgenic rats. *Hypertension*, 29:428–434, 1997.
- [17] G. E. P. Box and G. M. Jenkins. *Forecasting and Control*. Time Series Analysis. New York, 1976.
- [18] R. N. Bracewell. Die Fourier-Transformation. *Spek. d. Wissensch.*, 8:90–99, 1989.
- [19] E. Braun-Menendez, J. Fasciolo, L. Leloir, and J. Muñoz. La substancia hipertensora de la sangre del rinon isquemado. *Rev. Soc. Arg. Biol.*, 15:420–430, 1939.
- [20] J. Breuer. Die Selbststeuerung der Athmung durch den Nervus vagus. *Sitzber. d. k. Akad. d. W. math. naturw. Cl., Wien*, 58:909–937, 1868.

- [21] C. É. Brown-Séquard and J.-A. d'Arsonval. *Comptes rendus de l'Académie des sciences*, CXIV:400, 1892.
- [22] F. Bumpus, H. Schwarz, and I. Page. Synthesis and pharmacology of the octapeptide angiotonin. *Science*, 125:886–887, 1957.
- [23] A. Burton. The range and variability of the blood flow in the human fingers and the vasomotor regulation of body temperature. *Am. J. Physiol.*, 127:437–453, 1939.
- [24] G. C. Butler, B. L. Senn, and J. S. Floras. Influence of atrial natriuretic factor on heart rate variability in normal men. *Am. J. Physiol.*, 267(2 Pt 2):H500–H505, 1994.
- [25] C. C. J. Carpenter, J. O. Davis, C. R. Ayers, and A. Casper. Relation of renin, angiotensin II, and experimental hypertension to aldosterone secretion. *J. Clin. Invest.*, 40:2026–2042, 1961.
- [26] O. Carretero and F. Gross. Evidence for humoral factors participating in the renin-substrate reaction. *Circ. Res.*, 21(1):115+, 1967.
- [27] B. Casadei and D. J. Paterson. Should we still use nitrovasodilators to test baroreflex sensitivity? *J. Hypertens.*, 18(1):3–6, 2000.
- [28] C. Cerutti, C. Barrès, and C. Paultre. Baroreflex modulation of blood pressure and heart rate variabilities in rats: assessment by spectral analysis. *Am. J. Physiol.*, 266:H1993–H2000, 1994.
- [29] C. Cerutti, M. P. Gustin, C. Z. Paultre, M. Lo, C. Julien, M. Vincent, and J. Sassard. Autonomic nervous system and cardiovascular variability in rats: a spectral analysis approach. *Am. J. Physiol.*, 261:H1292–H1299, 1991.
- [30] Charles River Laboratories. Products and services: Animal research models. [www.criver.com](http://www.criver.com), 2003.
- [31] J. J. Cordero, J. González, and M. Feria. Effects of N<sup>ω</sup>-monomethyl-L-arginine on short-term RR interval and systolic blood pressure oscillations. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 24(2):323–327, 1994.
- [32] L. Danckwardt, I. Shimizu, G. Bönner, R. Rettig, and T. Unger. Converting enzyme inhibition in kinin-deficient brown Norway rats. *Hypertension*, 16:429–435, 1990.

- [33] Data Sciences International (DSI). Products - biomedical research. <http://datasci.com>, 2003.
- [34] J. O. Davis, C. C. J. Carpenter, C. R. Ayers, J. E. Holman, R. C. Bahn, A. Casper, and E. Cavanaugh. Evidence for secretion of an aldosterone-stimulating hormone by the kidney. *J. Clin. Invest.*, 40:684–696, 1961.
- [35] H. G. Deane and G. M. C. Masson. Adrenal cortical changes in rats with various types of experimental hypertension. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 11:193–208, 1951.
- [36] D. F. Elliot and W. S. Peart. Amino-acid sequence in a hypertensin. *Nature*, 177(4507):527–528, 1956.
- [37] W. Forth, D. Henschler, and W. Rummel. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Wissenschaftsverlag Mannheim/Wien/Zürich, 1987.
- [38] S. M. Galli and M. I. Phillips. Angiotensin II AT(1A) receptor antisense lowers blood pressure in acute 2-kidney, 1-clip hypertension. *Hypertension*, 38(3 Pt 2):674–678, 2001.
- [39] W. F. Ganong and P. J. Mulrow. Evidence of secretion of an aldosterone-stimulating substance by the kidney. *Nature*, 190(4781):1115–1116, 1961.
- [40] D. Ganten, J. Wagner, K. Zeh, M. Bader, J. B. Michel, M. Paul, F. Zimmermann, P. Ruf, U. Hilgenfeldt, U. Ganten, M. Kaling, S. Bachmann, A. Fukamizu, J. J. Mullins, and K. Murakami. Species specificity of renin kinetics in transgenic rats harboring the human renin and angiotensin genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 89(16):7806–7810, 1992.
- [41] E. Gaudet, J. Blanc, and J.-L. Elghozi. Effects of losartan on short-term variability of blood pressure in SHR and WKY rats. *Fundam. Clin. Pharmacol.*, 9(1):30–36, 1995.
- [42] J. Giese, M. Jörgensen, M. Damkjær Nielsen, J. O. Lund, and O. Munck. Plasma renin concentration measured by use of radioimmunoassay for angiotensin I. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 26:355–367, 1970.
- [43] H. Goldblatt, J. Lynch, R. F. Hanzal, and W. W. Summerville. Studies on experimental hypertension: I. The production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. *J. Exp. Med.*, 59:347–379, 1934.



- [44] D. S. Goldstein, D. Horwitz, and H. R. Keiser. Comparison of techniques for measuring baroreflex sensitivity in man. *Circulation*, 66(2):432–439, 1982.
- [45] T. L. Goodfriend and D. L. Ball. *Renin and the angiotensins*. Handbook of radioimmunoassay. Dekker, M. Inc., Academic Press, New York, 1977.
- [46] M.-L. Grichois, J. Blanc, V. Deckert, and J.-L. Elghozi. Differential effects of enalapril and hydralazine on short-term variability of blood pressure and heart rate in rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 19:863–869, 1992.
- [47] F. Gross. Control of aldosterone secretion by the renin-angiotensin system and by corticotropin. *Adv. Intern. Med.*, 14:281–339.
- [48] F. Gross. Renin und Hypertensin, Physiologische oder pathologische Wirkstoffe? *Klin. Wschr.*, 36(15):693–706, 1958.
- [49] F. Gross. The regulation of aldosterone secretion by the renin-angiotensin system under various conditions. *Acta Endocrinol. (Copenh.)*, 124:S124–S141, 1968.
- [50] F. D. Gutmann, H. Tagawa, E. Haber, and A. C. Barger. Renal arterial pressure, renin secretion, and blood pressure control in trained dogs. *Am. J. Physiol.*, 224(1):66–72, 1973.
- [51] A. C. Guyton, A. E. Taylor, and H. J. Granger. *Circulatory physiology II: dynamics and control of body fluids*. Saunders, Philadelphia, 1975.
- [52] S. Hales. *Statical Essays*, volume II of *Haemastaticks*. Innings and Manby, London, Feb 1973.
- [53] R. Hatton, D. Clough, K. Faulkner, and J. Conway. Angiotensin-converting enzyme inhibitor resets baroreceptor reflexes in conscious dogs. *Hypertension*, 3(6):676–681, 1981.
- [54] I. Hayashi, S. Hoshiko, O. Makabe, and S. Oh-ishi. A point mutation of alanine 163 to threonine is responsible for the defective secretion of high molecular weight kininogen by the liver of brown Norway Katholiek rats. *J. Biol. Chem.*, 268:17219–17224, 1993.
- [55] E. Hering and J. Breuer. Die Selbststeuerung der Athmung durch den Nervus vagus. *Sitzber. d. k. Akad. d. W. math. naturw. Cl., Wien*, 47:672–677, 1868.

- [56] R. L. Hughson, L. Quintin, G. Annat, Y. Yamamoto, and C. Gharib. Spontaneous baroreflex by sequence and power spectral methods in humans. *Clinical Physiol.*, 13:663–676, 1993.
- [57] B. W. Hyndman, R. I. Kitney, and B. McA. Sayers. Spontaneous rhythms in physiological control systems. *Nature*, 233:339–341, 1971.
- [58] C. Julien, Z. Q. Zhang, C. Cerutti, and C. Barrès. Hemodynamic analysis of arterial pressure oscillations in conscious rats. *J. Auton. Nerv. Syst.*, 50:239–252, 1995.
- [59] A. Just, U. Wittman, B. Nafz, C. D. Wagner, H. Ehmke, H. R. Kirchheim, and P. B. Persson. The blood pressure buffering capacity of nitric oxide by comparison to the baroreceptor reflex. *Am. J. Physiol.*, 267:H521–H527, 1994.
- [60] A. Kardos, G. Watterich, R. de Menezes, M. Csanady, B. Casadei, and L. Rudas. Determinants of spontaneous baroreflex sensitivity in a healthy working population. *Hypertension*, 37(3):911–916, 2001.
- [61] R. E. Katholi, P. L. Whitlow, S. R. Winternitz, and S. Oparil. Importance of the renal nerves in establishes two-kidney, one clip Goldblatt Hypertension. *Hypertension*, 4(suppl II):II166–II174, 1982.
- [62] M. Katori and M. Majima. Role of the renal kallikrein-kinin system in the development of hypertension. *Immunopharmacology*, 36(2-3):237–242, 1997.
- [63] R. I. Kitney. Entrainment of the human RR interval by thermal stimuli. *J. Physiol. (Lond)*, 252(2):37P–38P, 1975.
- [64] R. I. Kitney and O. Rompelman. Thermal entrainment patterns in heart rate variability. *J. Physiol.*, 270(1):41P–42P, 1977.
- [65] P. Krahe, K. G. Hofbauer, and F. Gross. Effects of endogenous renin on the function of the isolated kidney. *Life Sci. I.*, 9(22):1317–1320, 1970.
- [66] J. H. Laragh, M. Angers, W. G. Kelly, and S. Lieberman. Hypotensive agents and pressor substances: the effect of epinephrine, norepinephrine angiotensin II and others on the secretory rate of aldosterone in man. *JAMA*, 174:234–240, 1960.
- [67] W. B. Lee, M. J. Ismay, and E. R. Lumbers. Mechanisms by which angiotensin II affects the heart rate of the conscious sheep. *Circ. Res.*, 47(2):286–292, 1980.

- [68] K. E. Lentz, L. T. Skeggs, Jr., K. R. Woods, J. R. Kahn, and N. P. Shumway. The amino acid composition of hypertensin II and its biochemical relationship to hypertensin I. *J. Exp. Med.*, 104:183–191, 1956.
- [69] P. Madeddu, P. P. Parpaglia, M. P. Demontis, M. V. Varoni, M. C. Fattaccio, and N. Glorioso. Chronic inhibition of bradykinin B2-receptors enhances the slow vasopressor response to angiotensin II. *Hypertension*, 23(5):646–652, 1994.
- [70] M. Majima, S. Mizogami, Y. Kuribayashi, M. Katori, and S. Oh-Ishi. Hypertension induced by a nonpressor dose of angiotensin II in kininogen-deficient rats. *Hypertension*, 24:111–119, 1994.
- [71] M. Majima, O. Yoshida, H. Mihara, T. Muto, S. Mizogami, Y. Kuribayashi, M. Katori, and S. Oh-ishi. High sensitivity to salt in kininogen-deficient brown norway katholiek rats. *Hypertension*, 22:705–714, 1993.
- [72] A. Malliani, M. Pagani, F. Lombardi, and S. Cerutti. Cardiovascular neural regulation explored in the frequency domain. *Circulation*, 84(2):482–492, 1991.
- [73] R. Malvano, G. C. Zucchelli, U. Rosa, and A. Salvetti. Measurement of plasma renin activity by angiotensin I radioimmunoassay: (I) an assessment of some methodological aspects. *J. Nucl. Biol. Med.*, 16(1):24–31, 1972.
- [74] S. Matsukawa and I. A. Reid. Role of the area postrema in the modulation of the baroreflex control of heart rate by angiotensin II. *Circ. Res.*, 67(6):1462–1473, 1990.
- [75] S. Mayer. Studien zur Physiologie des Herzens und der Blutgefäße. Über spontane Blutdruckschwankungen. *Sitzungsb. d. k. Akad. d. W. math. nat. Cl., Wien*, 74:281–307, 1876.
- [76] D. Montague, B. Riniker, H. Brunner, and F. Gross. Synthesis and biological activities of a tetradecapeptide renin substrate. *Am. J. Physiol.*, 210(3):591–594, 1966.
- [77] M. R. Moyses, A. M. Cabral, D. Marcal, and E. C. Vasquez. Sigmoidal curve-fitting of baroreceptor sensitivity in renovascular 2K1C hypertensive rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 27(6):1419–1424, 1994.
- [78] M. Pagani, F. Lombardi, S. Guzzetti, O. Rimoldi, R. Furlan, P. Pizzinelli, G. Sandrone, G. Malfatto, S. Dell’Orto, E. Piccaluga, M. Turiet, G. Baselli, S. Cerutti, and A. Malliani. Power spectral analysis of heart rate and arterial

pressure variabilities as a marker of sympatho-vagal interaction in man and conscious dog. *Circ. Res.*, 59:178–193, 1986.

- [79] I. H. Page. On the nature of the pressor action of renin. *J. Exp. Med.*, 70:521–542, 1939.
- [80] I. H. Page and O. M. Helmer. A crystalline pressor substance (angiotonin) resulting from the reaction between renin and renin activator. *J. Exp. Med.*, 71:29–42, 1940.
- [81] G. Parati, J. P. Saul, M. Di Rienzo, and G. Mancia. Spectral analysis of blood pressure and heart rate variability in evaluating cardiovascular regulation: a critical appraisal. *Hypertension*, 25:1276–1286, 1995.
- [82] W. S. Peart. Composition of a hypertensin peptide. *Nature*, 17:132, 1956.
- [83] P. B. Persson. Spectrum analysis of cardiovascular time series. *Am. J. Physiol.*, 273(42):R1201–R1210, 1997.
- [84] P. B. Persson, H. Stauss, O. Chung, U. Wittmann, and T. Unger. Spectrum analysis of sympathetic nerve activity and blood pressure in conscious rats. *Am. J. Physiol.*, 263:H1348–H1355, 1992.
- [85] P. Ponchon and J.-L. Elghozi. Contribution of humoral systems to short-term variability of blood pressure in renovascular hypertensive rats. *Arch. Mal. Coeur Vaiss.*, 88(8):1203–1207, 1995.
- [86] P. Ponchon and J.-L. Elghozi. Contribution of the renin-angiotensin and kallikrein-kinin system to short-term variability of blood pressure in two-kidney, one-clip hypertensive rats. *Europ. J. Pharmacol.*, 297:61–70, 1996.
- [87] P. Ponchon, M.-L. Grichois, and J.-L. Elghozi. Effect of losartan on short-term variability of blood pressure of renovascular hypertensive rats: a spectral study. *J. Hypertens.*, 11 (Suppl. 5):S244–S245, 1993.
- [88] P. Ponchon, M.-L. Grichois, J.-P. Girolami, and J.-L. Elghozi. Effects of bradykinin on short-term variability in blood pressure and heart rate in rats: a spectral study. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 25:914–923, 1995.
- [89] M. Pravanec, V. Kren, J. Kunes, A. G. Scicli, O. A. Carretero, L. Simonet, and T. W. Kurtz. Cosegregation of blood pressure with a kallikrein gene familiy polymorphism. *Hypertension*, 17:242–246, 1991.

- [90] K. Sato, F. Chatani, and S. Sato. Circadian and short-term variabilities in blood pressure and heart rate measured by telemetry in rabbits and rats. *J. Autonom. Nerv. Sys.*, 54:235–246, 1995.
- [91] M. A. Sattar, A. P. Yusof, E. K. Gan, T. W. Sam, and E. J. Johns. Acute renal failure in 2K2C Goldblatt hypertensive rats during antihypertensive therapy: comparison of an angiotensin AT1 receptor antagonist and clonidine analogues. *J. Auton. Pharmacol.*, 20(5-6):297–304, 2000.
- [92] B. McA. Sayers. *Analysis of heart rate variability*, volume 16 of *Ergonomics*. 1973.
- [93] S. A. Simpson, J. F. Tait, A. Wettstein, R. Neher, J. v. Euw, and T. Reichstein. Isolierung eines neuen kristallisierten Hormons aus Nebennieren mit besonders hoher Wirksamkeit auf den Mineralstoffwechsel. *Experientia*, IX(9):333–335, 1953.
- [94] L. T. Skeggs, Jr., J. R. Kahn, K. E. Lentz, and S. N. P. The preparation, purification, and amino acid sequence of a polypeptide renin substrate. *J. Exp. Med.*, 106:439–453, 1957.
- [95] L. T. Skeggs, Jr., J. R. Kahn, and N. P. Shumway. The isolation and assay of hypertensin from the blood. *J. Exp. Med.*, 95:241–246, 1952.
- [96] L. T. Skeggs, Jr., J. R. Kahn, and N. P. Shumway. The preparation and function of the hypertensin-converting enzyme. *J. Exp. Med.*, 103:295–299, 1956.
- [97] L. T. Skeggs, Jr., J. R. Kahn, and N. P. Shumway. The purification of hypertensin II. *J. Exp. Med.*, 103:301–307, 1956.
- [98] L. T. Skeggs, Jr., K. E. Lentz, J. R. Kahn, N. P. Shumway, and K. R. Woods. Amino acid sequence of hypertensin II. *J. Exp. Med.*, 104:193–197, 1956.
- [99] L. T. Skeggs, Jr., W. H. Marsh, J. R. Kahn, and N. P. Shumway. The existence of two forms of hypertensin. *J. Exp. Med.*, 99:275–282, 1954.
- [100] L. T. Skeggs, Jr., W. H. Marsh, J. R. Kahn, and N. P. Shumway. The purification of hypertensin I. *J. Exp. Med.*, 100:363–370, 1954.
- [101] H. S. Smyth, P. Sleight, and G. W. Pickering. Reflex regulation of arterial pressure during sleep in man. A quantitative method of assessing baroreflex sensitivity. *Circ. Res.*, 24(1):109–121, 1969.
- [102] H. M. Stauss. XmAD. <ftp://sunsite.unc.edu/pub/Linux/science/lab/>, 2002.

- [103] H. M. Stauss. XmStat. <ftp://sunsite.unc.edu/pub/Linux/science/lab/>, 2002.
- [104] H. M. Stauss. XmAna. <ftp://sunsite.unc.edu/pub/Linux/science/lab/>, 2003.
- [105] H. M. Stauss, A. K. Johnson, P. B. Persson, and K. C. Kregel. Frequency response characteristic of autonomic nervous system function in conscious rats. *J. Hypertens.*, 15 (Suppl. 4):S28, 1997. [Abstract].
- [106] H. M. Stauss, K. C. Kregel, E. A. Anderson, W. Haynes, and P. B. Persson. Frequency response characteristic of sympathetic-mediated vasomotor waves in men. *Europ. J. Physiol.*, 433 (Suppl.)(6):R25–R25, 1997. [Abstract].
- [107] H. M. Stauss, K. C. Kregel, A. K. Johnson, and P. B. Persson. Frequency response characteristic of autonomic nervous system function in conscious rats. *Europ. J. Physiol.*, 433 (Suppl.)(6):R75–R75, 1997. [Abstract].
- [108] H. M. Stauss, K. C. Kregel, and P. B. Persson. Frequency response characteristic of sympathetic-mediated vasomotor waves in conscious rats. *Europ. J. Physiol.*, 433 (Suppl.)(6):R74–R74, 1997. [Abstract].
- [109] H. M. Stauss, D. A. Morgan, K. E. Anderson, M. P. Massett, and K. C. Kregel. Modulation of baroreflex sensitivity and spectral power of blood pressure by heat stress and aging. *Am. J. Physiol.*, 272(41):H776–H784, 1997.
- [110] H. M. Stauss, R. Mrowka, B. Nafz, A. Patzak, T. Unger, and P. B. Persson. Does low frequency power of arterial blood pressure reflect sympathetic tone? *J. Auton. Nerv. Syst.*, 54(2):145–154, 1995.
- [111] H. M. Stauss and P. B. Persson. Power spectral analysis of heart rate and blood pressure: markers for autonomic balance or indicators of baroreflex control? *Clin. Sci.*, 88(1):1–2, 1995.
- [112] H. M. Stauss, P. B. Persson, A. K. Johnson, and K. C. Kregel. Frequency response characteristic of autonomic nervous system function in conscious rats. *Am. J. Physiol.*, 273(42):H786–H795, 1997.
- [113] H. M. Stauss, R. Rettig, P. B. Persson, and T. Unger. Blood pressure oscillations are feedback-controlled by the autonomic nervous system. *J. Hypertension*, 10(Suppl.4):S47–S47, 1992. [Abstract].

- [114] D. F. Su, C. Cerutti, C. Barres, C. Julien, M. Vincent, C. Paultre, and J. Sassard. Arterial baroreflex control of heart period is not related to blood pressure variability in conscious hypertensive and normotensive rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 19:767–776, 1992.
- [115] P. Sventek, A. Turgeon, R. Garcia, and E. L. Schiffrin. Vascular and cardiac overexpression of endothelin-1 gene in one-kidney, one clip Goldblatt hypertensive rats but only in the late phase of two-kidney one clip Goldblatt hypertension. *J. Hypertens.*, 14(1):57–64, 1996.
- [116] R. Tigerstedt and P. G. Bergman. Niere und Kreislauf. *Skand. Arch. Physiol.*, 8:223–271, 1898.
- [117] L. Traube. Ueber periodische Thätigkeits-Aeusserungen des vasomotorischen und Hemmungs-Nervencentrums. *Centrbl. Med. Wiss.*, 56:881–885, 1865.
- [118] J. H. Tulen, A. J. Man in't Veld, A. M. Van Roon, P. Moleman, H. G. Van Steenis, P. J. Blankestijn, and F. Boomsma. Spectral analysis of hemodynamics during infusions of epinephrine and norepinephrine in men. *J. Appl. Physiol.*, 76(5):1914–1921, 1994.
- [119] R. S. Vasan, M. G. Larson, E. P. Leip, J. C. Evans, C. J. O'Donnell, W. B. Kannel, and D. Levy. Impact of high-normal blood pressure on the risk of cardiovascular disease. *N. Engl. J. Med.*, 345(18):1291–1297, 2001.
- [120] F. Volhard and T. Fahr. *Die Brightsche Nierenkrankheit: Klinik, Pathologie und Atlas*. Springer, Berlin, 1914.
- [121] A. N. Wadworth, D. Murdoch, and R. N. Brogden. Atenolol - a reappraisal of its pharmacological properties and therapeutic use in cardiovascular disorders. *Drugs*, 42:468–510, 1991.
- [122] H. R. Warner and A. Cox. A mathematical model of heart rate control by sympathetic and vagus efferent information. *J. Appl. Physiol.*, 17:349–355, 1962.
- [123] L. L. Watkins, C. Fainman, J. Dimsdale, and M. G. Ziegler. Assessment of baroreflex control from beat-to-beat blood pressure and heart rate changes: a validation study. *Psychophysiology*, 32(4):411–414, 1995.
- [124] WHO. Guidelines for the management of hypertension: 1999 World Health Organization - International Society of Hypertension. *J. Hypertens.*, 17(2):151–183, 1999.

- [125] H. Y. T. Yang, E. G. Erdős, and Y. Levin. A dipeptidyl carboxypeptidase that converts angiotensin I and inactivates bradykinin. *Biochem. Biophys. Acta*, 214:274–377, 1970.
- [126] Z. Q. Zhang, C. Julien, M. P. Gustin, C. Cerutti, and C. Barres. Hemodynamic analysis of arterial blood pressure lability in sympathectomized rat. *Am. J. Physiol.*, 267:H48–H56, 1994.



# Lebenslauf

## Persönliche Daten

<i>Name, Vorname</i>	Hoff, Thomas
<i>Anschrift</i>	Mozartstr. 56 24837 Schleswig
<i>Geburtsdatum</i>	16.10.1973
<i>Geburtsort</i>	Ulm/Donau
<i>Familienstand</i>	ledig
<i>Konfession</i>	römisch-katholisch
<i>Eltern</i>	Prof. Dr. med. Hanns-Georg Hoff, verstorben am 04.01.1992 Martha Hoff, geb. Parbs
<i>Geschwister</i>	Dr. med. dent. Nicole Hoff

## Schule

<i>Grundschule</i>	1980-1983	Cranach-Schule, Essen
	1983-1984	Josef-Schule, Gütersloh
<i>Gymnasium</i>	1984-1993	Evangelisch-Stiftisches-Gymnasium, Gütersloh
<i>Abitur</i>	06/93	Evangelisch-Stiftisches-Gymnasium, Gütersloh

## Medizinstudium

<i>Vorklinik</i>	10/93-10/95	Humboldt-Universität, Berlin
<i>Physikum</i>	09/95	Humboldt-Universität, Berlin
<i>Klinischer Teil</i>	10/95-05/00	Humboldt-Universität, Berlin
<i>I. Staatsexamen</i>	11/96	Humboldt-Universität, Berlin
<i>II. Staatsexamen</i>	04/99	Humboldt-Universität, Berlin
<i>III. Staatsexamen</i>	05/00	Humboldt-Universität, Berlin

## Auslandsaufenthalte

09/98-11/98	Famulatur im Fach Endokrinologie, Natl. Institutes of Health (NIH), Bethesda/USA
08/99-12/99	Zweiter Abschnitt des Praktischen Jahres im Fach Pädiatrie, Natl. Institutes of Health (NIH), Bethesda/USA

## Klinische und Wissenschaftliche Ausbildung

07/93-10/93	Freiwilliges Soziales Jahr, Städtisches Krankenhaus, Gütersloh
11/94-12/99	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Physiologie, Charité Campus Berlin-Mitte
03/96	Famulatur Chirurgie, St. Elisabeth Hospital, Gütersloh
02/97	Famulatur Gastroenterologie, Virchow-Klinikum, Charité Campus Berlin-Wedding
08/97	Famulatur Pädiatrie (Praxis), Berlin
09/98-11/98	Famulatur Endokrinologie, Natl. Institutes of Health (NIH), Bethesda/USA
04/99-08/99	1. Tertial des Praktischen Jahres, Chirurgie, Robert-Rössle-Klinik, Charité Campus Berlin-Buch
08/99-12/99	2. Tertial des Praktischen Jahres, Pädiatrie, Natl. Institutes of Health, Bethesda/USA
12/99-03/00	3. Tertial des Praktischen Jahres, Kardiologie, Franz-Volhard-Klinik, Charité Campus Berlin-Buch
11/00-10/01	Arzt im Praktikum, Innere Medizin, Franz-Volhard-Klinik, Charité Campus Berlin-Buch
11/01-04/02	Arzt im Praktikum, Innere Medizin, Virchow-Klinikum, Charité Campus Berlin Wedding
seit 07/02	Assistenzarzt, Innere Medizin, Martin-Luther-Krankenhaus, Schleswig

## Kongresse und Weiterbildungen

03/96	Kongreß für die Versorgung von Schwerstbrandverletzten, Gütersloh
05/96	Deutscher Ärztekongreß, Berlin
03/97	German-Scandinavian Physiology Congress, Hamburg
05/97	Deutscher Ärztekongreß, Berlin
03/97	Turkish-German-Italian Joint Meeting on Hypertension and Atherosclerosis, Antalya/Türkei
05/98	Deutscher Ärztekongreß, Berlin
09/98	A Review of Endocrinology: Diagnosis and Treatment, Bethesda/USA
06/99	8. Berliner Onkologisches Sommerseminar, Charité Berlin

## Artikel

**T. Hoff, P. B. Persson, A. Skalweit, and H. M. Stauss.** Contribution of the renin-angiotensin system to very low frequency blood pressure fluctuations in conscious rats. *[submitted]*

**L. Macho, J. Koska, L. Ksinantova, K. Pacak, T. Hoff, V. B. Noskov, A. I. Grigoriev, M. Vigas, and R. Kvetnansky.** The response of endocrine system to stress loads during space flight in human subject. *Adv. Space Res.*, 31(6):1605-10, 2003.

**K. Pacak, O. Tjurmina, M. Palkovits, D. S. Goldstein, C. A. Koch, T. Hoff, and G. P. Chrousos.** Chronic hypercortisolemia inhibits dopamine synthesis and turnover in the nucleus accumbens: an *in vivo* microdialysis study. *Neuroendocrinology*, 76(3):148-57, 2002 Sep.

**R. Kvetnansky, L. Macho, J. Koska, K. Pacak, T. Hoff, L. Ksinantova, V. B. Noskov, E. Kobzev, A. I. Grigoriev, and M. Vigas.** Effect of microgravity on plasma catecholamine responses to stressors during space flight. *J. Gravit. Physiol.*, 8(1):P129-30, 2001 Jul.

**K. Pacak, O. Tjurmina, M. Palkovits, D. S. Goldstein, C. A. Koch, T. Hoff, P. Goldsmith, G. P. Chrousos, E. L. Sabban, and R. Kvetnansky.** Chronic hypercortisolemia inhibits dopaminergic activity in the nucleus accumbens. In *Stress: Neural, Endocrine and Molecular Studies*, 1999, pp. 33-36.

## Publizierte Abstracts

**H. M. Stauss, T. Hoff, E. Khendoguina, and P. B. Persson.** Contribution of the renin-angiotensin system to very low frequency blood pressure fluctuations in conscious rats. *Europ. J. Physiol.*, 435 (Suppl. 6):R78, 1998.

**H. M. Stauss, E. Khendoguina, T. Hoff, and P. B. Persson.** Frequency characteristics of autonomic nervous system mediated heart rate fluctuations in humans. *Fundam. Clin. Pharmacol.*, 12 (Suppl 1):80s, 1998.

## Vorträge auf Internationalen Konferenzen

**H. M. Stauss, T. Hoff, E. Khendoguina, and P. B. Persson.** Contribution of the renin-angiotensin system to very low frequency blood pressure fluctuations in conscious rats. (*Joint Congress of the German and Scandinavian Physiological Societies, Hamburg/Deutschland, 1998*).

**T. Hoff, E. Khendoguina, P. B. Persson, and H. M. Stauss.** Modulation of very low frequency blood pressure fluctuations by the renin-angiotensin system in conscious rats. (*Turkish - German - Italian Joint Meeting on Hypertension and Atherosclerosis, Antalya/Türkei, 1998*).

**T. Hoff, E. Khendoguina, P. B. Persson, H. M. Stauss.** Are very low frequency fluctuations of arterial blood pressure related to the activity of the renin-angiotensin system? (*9<sup>th</sup> European Students Conference of the Charité, Berlin/Deutschland, 1998*).

## Sonstiges

Übersetzer bei der 15. Auflage des **Harrisons Innere Medizin** - Dt. Ausg. / in Zusammenarbeit mit der Charité. Hrsg. der dt. Ausg. *M. Dietel, J. Dudenhausen, N. Suttrop* - Berlin; Leiben: ABW, Wiss.-Verl., 2003.

# **Erklärung an Eides Statt**

Hiermit erkläre ich, Thomas Hoff, daß die vorliegende Dissertation „Einfluß einer chronischen Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems auf die Variabilität von Blutdruck und Herzfrequenz bei wachen Ratten“ von mir selbst und ohne Hilfe Dritter verfaßt wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Schleswig, den 01.03.04  
13. September 2004

# Danksagung

Abschließend möchte ich mich bei all denen bedanken, die mich während des experimentellen Teils meiner Promotion begleitet und bei der Erstellung der Dissertationsschrift unterstützt haben.

In erster Linie gilt mein Dank meinem Betreuer Prof. Dr. med. H.-M. Stauss für die Überlassung des Promotionsthemas und seine vorbildliche fachliche und menschliche Anleitung. Mit ihm stand mir ein kompetenter Ansprechpartner in theoretischen, experimentellen und computertechnischen Fragen zur Seite. Aber auch bei beruflichen oder privaten Entscheidungen waren mir seine Ratschläge stets äußerst hilfreich.

Meinem Doktorvater Prof. Dr. med. P. B. Persson danke ich dafür, daß er mir die Möglichkeit gegeben hat, die Versuche im Rahmen meiner Promotion in den Laborräumen des Instituts für Physiologie durchführen zu können. Weiterhin danke ich ihm für die großartige Unterstützung vor und während meiner beiden Auslandsaufenthalte in Amerika.

Dem Referat für Forschung der Charité danke ich für die finanzielle Unterstützung im Rahmen der Studentischen Forschungsförderung.

Frau Amoneit bin ich für ihre Unterstützung bei der Durchführung der Experimente sehr dankbar.

Herrn Dipl.-Ing. C. Malonnek und Herrn Dipl.-Ing. M. Holtkamp danke ich für ihre langjährige Hilfe und für die uneingeschränkte Bereitschaft, mir bei Computerfragen helfend zur Seite zu stehen.

Ein besonderer Dank gilt meiner Freundin S. Rohlf für ihre unendliche Liebe und Geduld während der Erstellung der Promotion.

Zu guter letzt gilt der Dank meiner Mutter und meiner Schwester, die all die Jahre stets zu mir gehalten haben und mir den nötigen familiären Rückhalt während meines Studiums und meiner Promotion gegeben haben.